

UNIVERSITÉ DE NANCY

N° 36

1913-1914

THÈSE

présentée à l'Ecole Supérieure de Pharmacie

POUR OBTENIR

le Diplôme de Docteur de l'Université

(Mention Pharmacie)

PAR

Paul PELLISSIER

Pharmacien de 1^{re} classe

Ancien Pharmacien des Hôpitaux Militaires

Tyrosine et Tyrosamines

Réactions spécifiques. — Méthodes de recherches

Importance biologique

Soutenue le 18 Juillet 1914, devant le Jury d'Examen :

EXAMINATEURS DE LA THÈSE { MM. FAVREL, professeur *Président*
GUÉRIN, professeur, { *Juges.*
SARTORY, ch. de cours {

PARIS

OLLIER-HENRY, ÉDITEUR

26, Rue Monsieur-le-Prince, VI^e

1914

THÈSE
pour le Doctorat



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE NANCY

N° 36

1913-1914

THÈSE

présentée à l'Ecole Supérieure de Pharmacie

POUR OBTENIR

le Diplôme de Docteur de l'Université

(Mention Pharmacie)

PAR

Paul PELLISSIER

Pharmacien de 1^{re} classe

Ancien Pharmacien des Hôpitaux Militaires

Tyrosine et Tyrosamines

Réactions spécifiques. — Méthodes de recherches

Importance biologique



Soutenue le 18 Juillet 1914, devant le Jury d'Examen :

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

{ MM. FAVREL, professeur, *Président*
GUÉRIN, professeur, { *Juges*
SARTORY, ch. de cours {

PARIS

OLLIER-HENRY, ÉDITEUR

26, Rue Monsieur-le-Prince, VI^e

1914

UNIVERSITÉ DE NANCY

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Directeur : M. BRUNTZ, I Q, ̂.

Assesseur : M. FAVREL, I Q.

Professeurs :

MM. BRUNTZ, I Q ̂	Matière médicale
FAVREL, I Q	Chimie.
GRÉLOT, I Q	Pharmacie galénique.
GUÉRIN, I Q	Toxicologie et analyse chimique
LAVIALLE, Chargé du Cours. . .	Histoire naturelle.
SARTORY, A Q, ̂. Chargé du Cours.	Pharmacie chimique.

Agrégé ;

M. GIRARDET, A Q.	Chimie et toxicologie.
---------------------------	------------------------

Chargés de Cours ;

MM. FAVREL, I Q.	Chimie minérale.
GRÉLOT, I Q	Hydrologie.
GIRARDET, A Q.	Physique.
HOLLANDE	Histoire naturelle.
SARTORY, A Q, ̂	Microbiologie.
DAMIENS.	Chimie biologique.
VERNIER.	Hygiène

Chefs de Travaux :

MM. GIRARDET, A Q.	Chimie, analyse chimique, et toxicologie
HOLLANDE	Micrographie
ROCHE.	Pharmacie
PILLOT, chargé des travaux . . .	Physique.

Secrétariat :

MM. COIFFARD, I	Secrétaire.
PAQUIER, ̂, A	, Commis.

Secrétaire honoraire ; M. F. LAMBERT DES CILLEULS, ̂. M. I.

L'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE BIEN-AIMÉ

INTRODUCTION

Grâce aux importantes découvertes, faites durant ces vingt dernières années, sur l'évolution intra-organique des matières albuminoïdes, il paraît prouvé aujourd'hui que les albumines sont scindées sous l'influence des sucs digestifs et des microbes intestinaux en acides aminés. Mais au-delà du tube digestif, une fois dans le milieu interne que deviennent-elles ? sont-elles absorbées sous cette forme d'acides aminés ? sont-elles au contraire reconstituées à l'état d'albumine spécifique dans la paroi intestinale même ? La question reste obscure....

Parmi les acides aminés, les uns, amino-acides de la série grasse paraissent de dislocation facile, mais d'autres comme les amino-acides de la série aromatique, tyrosine et phénylalanine sont plus résistants. Quel est le mode employé par l'organisme vivant pour attaquer leur molécule ? Nous avons pensé qu'il s'agissait d'un processus de décarboxylation commun aux végétaux et aux animaux, d'une scission amenant la production pour la tyrosine par exemple que nous avons particulièrement en vue, d'une tyrosamine correspondante.

Pour appuyer notre pensée sur autre chose que sur des mots inventés pour les besoins de la cause, à la manière de maints pathologistes, ou sur de fragiles hypothèses, à la manière des philosophes, il nous fallait tout d'abord une méthode à la fois précise, sensible et sûre pour re-

chercher la tyrosine et les tyrosamines et pour les caractériser l'une et l'autre. On trouvera dans ce travail les résultats de nos efforts.

Une fois armé d'un procédé de recherches qui nous donnait satisfaction, nous avons recherché un peu partout dans les produits de l'être vivant la tyrosine et son amine et l'importance de ces corps nous est apparue telle que leur présence pourrait bien expliquer maints problèmes de physiologie pathologique encore fort obscurs.

À vrai dire, les auteurs n'ont pas été sans soupçonner l'importance et la fréquence, dans l'organisme, d'acides aminés de la série aromatique et d'amines issus d'amino-acides décarboxylés connus ou inconnus : Chez les végétaux, on trouve dans l'ergot de seigle une paraoxyphényléthylamine que l'industrie prépare synthétiquement et présente sous les noms de tyramine, utéramine et systogène. Cet amine produit une élévation de la pression sanguine, c'est de plus un toni-cardiaque et sous son influence les fibres lisses de l'utérus se contractent ; bref, il possède les propriétés pharmacodynamiques de l'ergot de seigle. Monsieur Léger, pharmacien des hôpitaux de Paris a trouvé dans les touraillons d'orge une tyrosamine, l'hordénine, qui agirait sur l'intestin par inhibition du péristaltisme, soutiendrait le cœur et permettrait à l'organisme de résister aux intoxications générales. Il est vraisemblable que l'orge possède l'amino-acide correspondant à cet amine ; on pourrait s'en assurer en appliquant à cette graine notre procédé de recherches des tyrosines.

Dans le ratanhia, on a décelé également la présence d'un isomère de la tyrosine.

Chez les animaux, Baumann a isolé dans la thyroïde un protéique iodé, l'iodothyryne, que la chimie identifie à la tyrosine sur laquelle s'est fixé de l'iode et les effets thérapeutiques remarquables de cette glande paraissent dûs à la présence de cet iodothyryne.

Takamine en isolant l'adrénaline des capsûles surrénales en a fait l'agent actif de ces glandes. Or il s'agit d'une amine issue d'un amino-acide prévu mais non isolé.

Certes ce sont là autant de preuves intéressantes de l'importance des amines dans les organismes vivants ; mais la question nous paraît être beaucoup plus vaste : nos recherches sur la présence des tyrosamines dans plusieurs laits, soupçonnés d'être frelatés parce qu'ayant occasionnés des indispositions, laissent envisager un étroit rapport entre certaines gastro-entérites et la question des amines.

D'autres recherches pourraient peut-être nous permettre de préciser et de traduire autrement qu'en mots sonores le grand problème pathologique de la nature des toxines... Certes, ce sont là de vastes projets d'études pour l'avenir, et si nous ne faisons que les effleurer ici, on voudra bien nous excuser et nous faire crédit, en songeant aux nécessités professionnelles qu'exige la direction d'une officine.

Nous nous sommes bornés dans ce travail à donner de nouvelles réactions vraiment spécifiques des tyrosines et des tyrosamines et des méthodes de recherches originales de ces corps ; nous avons décelé la présence des tyrosamines en de nombreux organes et liquides organiques où on ne les avait point signalées jusqu'ici ; enfin nous avons établi que la tyrosine se rencontre normalement

dans l'urine humaine et que les tyrosamines sont les agents de la diazoréaction d'Ehrlich.

Ces recherches pourront paraître à certains de médiocre envergure en comparaison des projets que nous signalions plus haut. Mais pour qui sait combien les expériences concernant la chimie biologique exigent de temps, de patience et de minutie, notre travail, nous l'espérons, ne sera pas sans intérêt, moins d'ailleurs pour nos recherches elles-mêmes que pour la possibilité que donne nos procédés d'investigation d'atteindre à quelques problèmes biologiques de solution jusqu'ici inaccessible.

Il est de bonne tradition, à la fin d'une préface de thèse, de remercier publiquement maîtres et amis, tous ceux qui par leur enseignement ou leurs conseils ont été pour nous des collaborateurs appréciés et sympathiques. Le professeur Sartory est, pour nous un éminent ami ; nous lui avons exposé nos recherches et nos idées ; entraîné sans doute par l'amitié qui est toujours quelque peu myope, sinon aveugle, le jeune Maître nous a conseillé cette thèse, nous n'avons su résister à ses désirs. Il a de plus présenté en notre nom à la société de biologie plusieurs communications relatives à nos recherches. Qu'il soit assuré de notre cordiale reconnaissance.

Monsieur le Docteur Burmann, directeur du laboratoire scientifique de la Zyma, nous a adressé plusieurs échantillons de paraoxyphényléthylamine synthétique qui nous ont permis d'identifier nos azoïques ; nous lui adressons bien sincèrement l'hommage de notre gratitude.

Le Docteur Henri Michaud est notre ami, je suis heureux de dire ici qu'on n'adresse jamais un vain appel à sa vaste érudition et à son dévouement.

Je tiens enfin à manifester toute ma sympathie à mon chimiste M. Gaston Chardet. Pour la 2^e fois il est mon collaborateur dans le laboratoire d'analyses médicales et industrielles de mon officine et s'acquitte de ses fonctions avec science et conscience. Nous nous sommes occupés ensemble de la question des tyrosamines ; il nous a permis également de puiser un extrait de son travail sur l'évolution des acides aminés dans le chimisme des sols, nous l'en remercions vivement. De tous les trésors il possède le plus précieux, la jeunesse, l'avenir lui permettra d'achever les recherches que nous poursuivrons ensemble et qui compléteront, je l'espère, l'œuvre dont ce modeste travail n'est que l'introduction. Enfin, qu'il nous soit permis d'adresser en terminant un souvenir ému à nos maîtres de l'Ecole supérieure de Pharmacie de Paris, de la Faculté de médecine de Bordeaux et du Val-de-Grâce ; ils sont, eux aussi, un peu les auteurs de cette thèse. Ils nous ont enseigné les sciences ; et surtout, ils nous ont donné le goût des recherches de laboratoire et fait apprécier le délicat plaisir de soulever tant soit peu le voile mystérieux de l'Inconnu.

CHAPITRE I

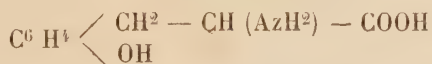
Réactions de la Tyrosine et des Tyrosamines

§ 1. RÉACTIONS DE LA TYROSINE

§ 2. RÉACTIONS DES TYROSAMINES

§ 1. — Réaction de la Tyrosine

La Tyrosine est un acide aminé appartenant à la série aromatique. Sa formule est la suivante :



Découverte par Liebig en traitant la caséine par la potasse, elle cristallise de sa solution ammoniacale en aiguilles soyeuses, solubles dans 1900 parties d'eau froide et 150 parties d'eau bouillante.

Elle n'est précipitée de ses solutions que par l'acétate de plomb ammoniacal.

Réactions d'identité :

I. Oxydée par le bichromate de potasse et l'acide sulfurique, elle donne des acides cyanhydrique, benzoïque, acétique et formique.

II. Traitée par la potasse, elle se dédouble en acide paraoxybenzoïque, acide acétique, ammoniaque.

III. Sa solution aqueuse précipite par le réactif de Millon, la liqueur devient rouge foncé à chaud et donne un précipité rouge (*Hofmann*).

IV. Mouillée avec quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, la tyrosine se dissout à la chaleur. Si l'on ajoute du carbonate de baryte à la solution étendue, jusqu'à neutralisation, qu'on fasse bouillir, qu'on filtre et qu'on ajoute à la liqueur du perchlorure de fer étendu, on obtient une belle coloration violette (*Piria*).

V. Le chlorure d'or et une trace d'acide formique colorent en violet les solutions de tyrosine même étendues.

VI. Evaporée à sec avec un peu d'acide azotique, elle fournit un résidu jaune de nitrate de nitrotyrosine virant à l'orange foncé par addition de soude.

VII. La macération du *Russula delica* donne avec les solutions de tyrosine une coloration rouge puis noire (*Bertrand, Bourquelot*).

VIII. Une solution alcoolique d'éthanal ou de paraldehyde ajoutée à de l'acide sulfurique pur donne avec la tyrosine une teinte groseille (*Denigès*).

IX. Une solution de tyrosine bouillie avec le réactif formol, eau, acide azotique concentré donne une coloration verte persistante (*Moërner*).

X. Une solution de tyrosine traitée par le sulfodiazobenzol donne une coloration jaune qui vire à l'orange par l'ammoniaque (*Pellissier*).

§ 2. — Réactions des Tyrosamines

Les tyrosamines sont caractérisées par la présence d'un groupe phénolique et d'un groupement aminé :



On peut donc se servir pour les distinguer de réactions basées sur les propriétés chimiques de ces deux groupements.

Il est nécessaire pour faire ces réactions d'avoir le corps à examiner dans un état de pureté assez grand et de disposer au moins d'une petite quantité.

I. Réactif de Millon : coloration rouge brun intense, cette réaction est une des plus caractéristiques.

II. Formation du bleu de Prusse avec les sels ferriques et ferrocyanure de potassium.

III. Réduction des sels d'or.

IV. Transformation instantanée de l'or colloïdal rouge en or colloïdal bleu, cette coloration bleue disparaît en partie après quelques heures à la suite de la précipitation du colloïde qui se dépose coloré en bleu (*Pellissier*).

V. Formation des chloro-aurates ou chloroplatinates malheureusement très solubles et difficilement utilisables.

VI. Formation de nitro-phénols et de bromo-phénols jaunes par l'action de l'acide nitrique ou du brome.

VII. Formation de dérivés benzoylés par la méthode de Baumann.

Toutes ces réactions ont l'inconvénient de ne pas être spécifiques, elles sont susceptibles d'être données par un grand nombre d'amines aromatiques.

VIII. Les tyrosamines en solution donnent avec le sulfodiazobenzol un azoïque virant au rouge après addition d'ammoniaque. (*Pellissier et Chardet*).

CHAPITRE II

Recherche et dosage de la Tyrosine et des Tyrosamines

§ 1. RECHERCHE ET DOSAGE DE LA TYROSINE

§ 2. RECHERCHE DES TYROSAMINES

§ 3. CARACTÉRISATION PAR LES AZOÏQUES

ANNEXE. — PROCÉDÉ DE RECHERCHES DES AMINO-ACIDES
EN GÉNÉRAL.

§ 1. — Recherche et dosage de la Tyrosine

Les auteurs se sont efforcés jusqu'à ce jour, de solubiliser la tyrosine et de concentrer les liqueurs d'extraction pour arriver à faire cristalliser la tyrosine. Ces méthodes présentent l'inconvénient de ne donner des résultats positifs qu'avec une teneur en tyrosine relativement élevée et dans une solution ne contenant que peu d'impuretés.

En effet la solubilité de la tyrosine dans l'eau étant de 1 pour 1900, on voit cette solubilité rapidement augmenter dans des liquides contenant de l'urée, des sels ammoniacaux, des acides aminés en diminuant d'autant la valeur des procédés par simple dissolution.

Nous devons insister sur ce fait que la tyrosine est susceptible de s'éliminer sous la forme tyrosine-hydantoï-

ne (1) très soluble et il est vraisemblable que dans les liquides organiques d'élimination, la tyrosine se trouve liée à des uréides, peptides, acides aminés, toutes liaisons empêchant ce corps de cristalliser sous sa forme habituelle. Dans les acides protéiques retirés de l'urine, dont certains présentent la *diazoréaction d'Ehrlich*, il est très probable qu'il se trouve dans leur molécule un groupe tyrosinique.

Ceci exposé, on a l'explication de l'échec des recherches de la tyrosine dans les urines normales. La présence de ce corps n'a été présumé que par *Pouchet et Ulrich* et l'opinion de ces savants a été mise en doute par *Gérard*. *Denigés* en mentionne la présence sans préciser s'il le trouve dans les urines normales ou pathologiques.

RECHERCHE ET DOSAGE DES CORPS DU GROUPE DE LA TYROSINE

Procédé de Causse (2). — Appliqué à la recherche de la tyrosine dans les eaux polluées. Il consiste à entraîner la tyrosine par l'hydrate de baryte, le précipité est repris par l'acide chlorhydrique qui laisse insoluble le sulfate de baryte, la tyrosine passe en solution et elle est titrée au moyen du diazobenzène sulfonate de soude par comparaison colorimétrique de la coloration orangée obtenue avec celle donnée par une solution titrée de tyrosine traitée par le sulfo-diazobenzène.

Ce procédé est inapplicable dans les produits organiques étant donné d'une part l'action précipitante de la baryte sur une grande quantité de substances, d'autre part la décomposition des sels ammoniacaux, la baryte libé-

(1) BLANDERMANN Zeit. Pys. chem., VI, p. 253.

(2) CAUSSE. Académie des sciences, 30 avril 1910.

rant de l'ammoniaque susceptible de dissoudre de la tyrosine et d'empêcher ainsi cette portion de rester sur le filtre. D'ailleurs les essais que nous avons tentés avec ce procédé ne nous ont donné que des résultats négatifs.

Procédé de Denigès (1). — Basé sur cette réaction : la tyrosine fournit avec l'éthanal, en milieu fortement sulfurique, un produit de condensation d'un beau rose carmin. Le réactif se prépare ainsi : 2 cm³ d'acide sulfurique pur sont additionnés de 3 à 5 gouttes d'une solution faite avec aldéhyde ordinaire 5 cm³ et alcool à 90° 10 cm³, en ayant soin de secouer vivement le tube à essai après chaque addition de goutte et de faire tomber directement chaque goutte dans l'acide pour éviter la formation d'une teinte jaunâtre gênant la réaction ultérieure. Dans ce mélange ainsi obtenu, on ajoute 1 à 2 gouttes de solution tyrosinique ; presque aussitôt la masse prend une belle coloration groseille dont l'intensité est en rapport avec la dose de tyrosine employée. La teinte très nette pour 1/50 de milligramme est encore appréciable pour 1/100 de milligramme. Par comparaison avec une solution titrée de tyrosine on peut faire un dosage colorimétrique rapide de ce produit. Cette réaction s'obtient facilement en présence du liquide de digestion pancréatique, de matières albuminoïdes et de peptones, même en présence de celles exemptes de tyrosine et avec l'urine, à condition de concentrer l'urine si la proportion est inférieure à 0 gr. 20 ctg de tyrosine par litre.

Procédé de Morner. — On fait bouillir solution tyrosinique avec 2 ou 3 cm³ du réactif suivant :

→	Formol à 40 %	1 volume
	Eau	45 —
	Acide azotique concentré	55 —

(1) DENIGES. Bull. Soc. Ph. Bordeaux 1900 ; T. 40 p. 45 49.

On obtient une coloration verte caractéristique.

Procédé Bertrand-Bourquelot. — Quelques gouttes d'une macération aqueuse de *Russula delica* préalablement broyé avec du sable sont ajoutées à 8 ou 10 cm³ de solution tyrosinique. On obtient une coloration d'abord rouge puis noire.

Procédé Pellissier.

1° DANS LES PRODUITS LIQUIDES, *par exemple dans l'urine* 200 cm³ d'urine à réaction acide sont déféquées par l'acétate neutre de plomb ; on filtre, on obtient un précipité et une liqueur. Le précipité contient les phosphates, chlorures, sulfates, pigments, une partie des purines (acide urique, urates, guanine et certains corps xanthiques), acide oxalique. Le filtrat renferme les sels ammoniacaux, l'urée, allantoïne, créatinine, acide hippurique, acides aromatiques, les dérivés de l'indol et du scatol, les polypeptides et les acides aminés. ,

Le filtrat est acidulé par l'acide sulfurique. On filtre à nouveau pour éliminer le plomb qui reste sur le filtre, on porte à l'ébullition, afin de chasser les phénols, pendant une dizaine de minutes, on laisse refroidir. Pour éliminer le restant des indol, scatol, dérivés oxyaromatiques (acide phénylpropionique, acide phénylacétique, acide oxyphénylacétique, acide oxyphénylpropionique) et l'acide succinique, on traite la solution par un mélange d'éther de pétrole et d'éther éthylique dans une ampoule à décantation. On agite les corps ci-dessus mentionnés restent dissous dans l'éther, on soutire la solution aqueuse qui ne contient plus que la tyrosine et les aminoacides phénoliques. Cette solution chauffée à l'ébullition est additionnée de nitrite de soude (0 gr. 10 à 0 gr. 20

etg.). Le liquide devient jaune franchement, on laisse refroidir et on additionne d'ammoniaque jusqu'à franche alcalinité, la liqueur devient d'un jaune d'autant plus intense que l'urine contient plus d'amino-acides phénoliques.

Dosage. — Pour la détermination quantitative on ramène avec de l'eau distillée le volume initial de 200 cm³ et on le compare au colorimètre avec des solutions titrées de nitro-tyrosine ammoniacale.

Discussion du procédé. — Les phénols et les corps oxyaromatiques donnant la réaction de Milon, celle à l'eau de Brome et celle des nitrophénols, il est important de les éliminer plus spécialement. C'est la raison pour laquelle nous traitons notre solution avec le mélange éther de pétrole-éther éthylique.

Dans notre filtrat, après traitement par l'acétate neutre de plomb, il fallait nous assurer que la solution ne contenait plus de corps puriques tels que guanine et corps xanthiques susceptibles d'être influencés par le nitrite de soude, à cet effet nous avons évaporé à consistance d'extrait une partie importante de cette solution, le résidu a été repris par l'alcool qui a dissout l'urée, les amino-acides, la tyrosine et a laissé insolubles les corps puriques qui auraient pu échapper à la précipitation par l'acétate de plomb. Il est resté un résidu contenant encore des sels ammoniacaux et minéraux sur lequel nous avons fait notre réaction qui est restée négative.

La coloration jaune terminale est bien produite par la nitro-tyrosine ; nous nous en sommes assurés par les recherches suivantes :

1. — Les dérivés phénoliques ou oxyaromatiques dou-

nent par nitration des nitro-phénols jaunes, ces dérivés sont solubles dans l'éther ; leur coloration n'augmente pas d'intensité par l'addition d'alcali ; or, la nitrotyrosine que nous avons obtenue ne cède rien à l'éther et sa coloration est d'une extrême sensibilité à l'action des alcalis.

II. — Les corps du groupe de l'indol et du scatol ne peuvent pas donner cette réaction pour les raisons suivantes :

a) Nous les éliminons en partie lors de l'ébullition avec l'acide sulfurique.

b) Nous dissolvons ce qui reste de ces produits dans notre liqueur par le traitement à l'éther — éther de pétrole.

c) L'indol donne avec l'acide nitreux et l'acide sulfurique des colorations rouges. (1) ou roses et le scatol ne donne aucune coloration.

III. — Notre liqueur obtenue en dernier lieu et avant la nitration est concentrée, le produit obtenu a été successivement traité par les réactifs mentionnés au chapitre I. Toutes ces réactions se sont montrées positives, particulièrement celles de *Denigès* et de *Moerner*.

Cette réaction est donc bien spécifique de la tyrosine soit libre, soit associé aux amino-acides, uréides et polypeptides.

Appliquée aux urines normales, c'est-à-dire aux urines émises par des personnes en apparence de bonne santé, cette méthode nous a permis de toujours constater la présence de tyrosine. Nous en avons trouvé de 0 gr. 010 milligrammes à 0 gr. 020 milligrammes en 24 h. Dans certaines urines pathologiques (cas d'alcaptonurie et de cystinurie exceptés) nous en avons constaté jusqu'à 150 milligrammes.

(1) KITISATO Zeit. fur, hyg. 7, p. 515

II. DANS LES PRODUITS SOLIDES *par exemple peptone, pancréatines médicinales.*

50 grammes de produits divisés avec de la poudre de verre ou du sable purifié sont traités par de l'alcool ammoniacal chaud (alcool 100 grammes, ammoniaque 2 à 3 cm³) après expression de liquide est filtré, on chasse l'ammoniaque par ébullition. On laisse refroidir. le liquide est traité par l'acétate neutre de plomb. Après addition d'acide sulfurique pour précipiter le plomb on filtre et la liqueur est nitrée à chaud comme ci-dessus.

Ces procédés sont plus longs en apparence qu'en réalité étant donné la densité des précipités plombiques, la rapidité de filtration des liquides chauds et l'active séparation des liquides éthérés d'avec les solutions aqueuses.

§ 2. — Recherche des tyrosamines.

Procédé d'Armand Gautier. — Les produits solides sont traités par de l'eau contenant un demi pour cent d'acide tartrique. On s'assure que la liqueur reste acidulée et on ajoute, s'il le faut, au mélange une solution du même acide. Après une digestion de 24 h., on filtre et on soumet à la presse pour extraire les dernières liqueurs. Si la matière est liquide on l'additionne directement d'acide tartrique.

Les liqueurs acidulées ainsi obtenues sont portées quelques instants à 100° pour coaguler les albumines et détruire ferments et microbes, puis filtrées après refroidissement. Les liqueurs sont alors réduites jusqu'à consistance sirupeuse, l'extrait ainsi obtenu est épuisé par l'éther pour enlever les corps gras, les acides etc... et traité par l'alcool bouillant qu'on évapore à consistance

sirupeuse. On mélange exactement cet extrait, au mortier, avec du bicarbonate de potasse jusqu'à réaction fortement alcaline, on divise avec du verre en poudre grossière et on épuise avec de l'alcool amylique. Ce dissolvant est agité avec de l'eau légèrement acidulée d'acide sulfurique ou mieux d'acide chlorydrique. Les tyrosamines passent dans la solution aqueuse dans laquelle on peut les caractériser.

Procédé Pellissier et Chardet (1). — Les produits, broyés s'il est nécessaire, sont traités par l'eau bouillante acidulée d'acide tartrique à 1 pour cent, la solution ainsi obtenue est concentrée de façon à n'avoir que 200 cm³ environ. S'il s'agit de liquides : urine, bouillon de culture, liquides de fermentation ou de putréfaction etc., on acidule légèrement par l'acide tartrique et on concentre.

La solution acide ainsi obtenue est additionnée d'acétate neutre de plomb jusqu'à cessation de précipité, on filtre. Le filtrat est acidulé par l'acide sulfurique et pour éliminer le sulfate de plomb formé on filtre à nouveau. La liqueur est agitée avec le mélange d'éther — éther de pétrole pour enlever les dérivés phénoliques, scatoliques et oxyaromatiques ; on décante. Le liquide est traité par l'acide sulfanilique nitreux et après agitation on ajoute de l'ammoniaque en léger excès, ce qui détermine le virage au rouge dans le cas de présence des tyrosamines. On ajoute alors de l'acétate neutre de plomb, le diazoïque est entraîné avec d'autres corps en un volumineux précipité rouge. On recueille ce précipité, on le lave à l'eau distillée froide, et on le reprend dans une capsule en porcelaine par de l'acide sulfurique au 1/5 froid et en

(1) PELLISSIER et CHARDET, congrès avanc. des sciences, le Havre, 1914.

quantité juste suffisante pour décomposer le sel de plomb. On filtre une dernière fois.

Formation du diazoïque. — Le liquide que l'on obtient est jaune foncé, il doit être aussi concentré que possible, quelques centimètres cubes, il est additionné de soude caustique jusqu'à neutralisation que l'on constate par un virage au rouge intense. On rend alors le mélange légèrement acide par addition de quelques gouttes d'acide chlorhydrique ce que l'on constate au virage de la solution qui passe au jaune orange. On ajoute de l'acétate de soude cristallisé jusqu'à saturation du liquide. On le voit alors se troubler, devenir chatoyant par suite de la précipitation du diazoïque en cristaux microscopiques jaunes.

Toutes ces manipulations doivent porter sur des liquides froids, toute élévation de température amenant la destruction du diazoïque.

On peut, si on le désire, afin d'obtenir de plus beaux cristaux, les recueillir sur un filtre, les traiter par de l'alcool bouillant (quelques centimètres cubes) qui abandonnera par le refroidissement des cristaux que l'on pourra sécher et peser. Cette opération permet le dosage des tyrosamines à condition toutefois de déterminer la solubilité de ces corps dans de l'eau saturée d'acétate de soude et dans l'alcool froid. La somme des deux chiffres trouvés constituerait un coefficient dont on pourrait, ou non, tenir compte.

§ 3. — **Caractérisation des diazoïques.**

Les azoïques obtenus doivent être formés de petits cristaux jaune orangé, ces cristaux passent au rouge vif sous l'action des alcalis et redeviennent jaune orange

par les acides. Sous l'influence des vapeurs d'ammoniaque les cristaux deviennent rouge vif et reprennent leur couleur primitive après le départ des vapeurs ammoniacales.

L'examen microscopique est le meilleur mode de caractérisation, voici la forme de quelques diazoïques provenant de produits naturels et synthétiques.

Azoïque de la Paraoxyphényléthylamine :



Cristaux jaunes, pommes épineuses, aiguilles courtes, groupées en rosace, en étoile ou isolées.

Azoïque obtenu avec l'ergot de seigle :



Cristaux jaunes, en aiguilles isolées ou groupées en compas, en trident, en touffes.

Azoïque provenant d'un crachal purulent à diazoréaction nettement positive :



Cristaux jaunes en aiguilles courtes, isolées ou groupées en rosaces.

*Azoïque tiré d'une urine d'un érysipélateur de 14 ans
à diazoréaction faiblement positive :*



Cristaux jaunes en aiguilles courtes isolées ou groupées
en étoiles, en rosaces.

*Azoïque de l'hordénine ou diméthylparahydroxyphé-
nyléthylamine :*

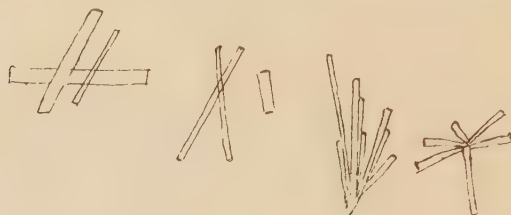


Cristaux jaunes aiguillés, fusiformes ; l'azoïque cristal-
lise facilement.

Nous nous sommes appliqués à obtenir des azoïques
cristallisés avec des corps voisins des tyrosamines notam-
ment :

I. — AVEC LA PARA-OXYBENZYLAMINE $\text{OH-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2(\text{AzH}^2)$
homologue inférieur de la tyrosamine, nous avons
opéré sur le produit synthétique, ce corps n'ayant ja-
mais été signalé dans les produits vivants.

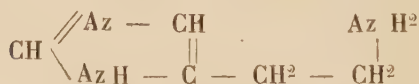
Azoïque de la para-oxybenzylamine :



Cristaux à peine colorés en jaune, quelques-uns ne sont même pas colorés en apparence étant donné leur faible épaisseur, en général ils sont lamellés et très minces.

Il nous paraît indispensable de signaler ici que la diazoreaction obtenue avec ce corps est orange foncé, de plus les cristaux de l'azoïque donnent avec l'ammoniaque une coloration brique orange.

II. — AVEC L'HISTAMINE ou β imidazol-éthylamine



ce corps nous semble particulièrement intéressant : c'est le seul qui ait été signalé comme donnant la diazocréation d'Erlich parmi tous les corps isolés des protéiques (Pauly, et encore a-t-il dit histidine). Il devenait donc utile de caractériser son diazoïque d'autant plus que cela nous permettait de le différencier nettement d'avec le diazoïque de la tyrosamine.

Azoïque de l'histamine :

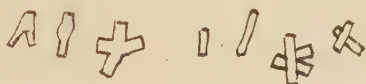


Aiguilles jaunes très fines en pinceau, croix ou touf-

fes ; il cristallise beaucoup plus difficilement que les autres azoïques ; de plus sa diazoréaction est extrêmement fugace.

III. — AVEC L' α -NAPHTYLAMINE $C^{10}H^7$ (AzH^2). Notre recherche a eu pour but de démontrer que les azoïques obtenus avec les amines aromatiques appartenant à d'autres groupes que celui des tyrosamines en étaient très différents au point de vue cristallographique.

Azoïque de l' α -naphtylamine :



Cristaux rouge brun.

Nous noterons également que la diazo-réaction est rouge mais seulement en milieu acide. L'action des alcalis sur les cristaux est inverse de l'action sur les cristaux des corps du groupe de la tyrosamine c'est-à-dire que l'ammoniaque les colore en jaune au lieu de les colorer en rouge.

Avant de terminer ce chapitre, nous désirons faire connaître qu'il ne nous a pas été possible d'obtenir l'azoïque cristallisé de l'adrénaline dans les conditions d'application de nos procédés. Nous obtenons une diazoréaction différant en deux sens de celle des corps de ce groupe :

Premièrement la couleur est en rouge vineux intense, elle de plus très fugace et extrêmement fragile.

Deuxièmement nous n'avons pas la possibilité de régénérer l'azoïque après diazotation nouvelle. Nous signale-

rons également que nous obtenons exactement la même diazoréaction avec la poudre desséchée de surrénales tandis que la poudre de reins nous donne la diazoréaction des tyrosamines.

Nous nous réservons d'étudier cette question afin de rechercher la cause de cet échec. Peut-être nous sera-t-il possible également de trouver, en partant des azoïques obtenus, les acides aminés dont dérivent l'hordénine et l'adrénaline par décarboxylation.

Qu'il nous soit permis en outre de tirer de ces caractérisations nouvelles des amino-acides aromatiques par les azoïques, un argument pour nous prévaloir d'avoir trouvé des réactions originales pour l'hordénine et l'adrénaline, et un procédé de différenciation entre l'histamine et la tyrosamine.

Annexe

PROCÉDÉ DE RECHERCHES DES AMINO-ACIDES EN GÉNÉRAL

Il nous paraît indispensable de mentionner dans ce travail les procédés employés par certains auteurs pour la recherche et le dosage des acides aminés. Evidemment ces méthodes ne sont pas spécifiques et pour quelques-unes de celles nouvellement publiées, il eut été nécessaire, à notre avis, de caractériser d'abord les acides aminés et de procéder ensuite à leur dosage.

Gulewitsch et S. Amiradzibi (1) recherchent la carnosine (alanine et histidine) dans l'extrait de viande de Liebig par le procédé suivant : ils en font une solution aqueuse qui est précipitée par l'acide phosphotungstique ,

(1) Zeit. phys. ch. t. 30, p. 565-573 ; 25/10, 1900.

le précipité débarrassé de l'acide à l'aide de la baryte fournit un filtrat que l'on neutralise et que l'on traite par le nitrate d'argent. Le nouveau filtrat, traité par la méthode de Kossel (2) par le nitrate d'argent et la baryte en excès donne un précipité contenant le nitrate de carnosine (aiguilles cristallisées en choux-fleurs).

M. Kruger et J. Schmid (3) dosent l'azote des acides aminés de l'urine par un procédé analogue à celui de Pfændler (4). Il repose sur la propriété qu'ont les acides aminés de n'être point précipités par l'acide phosphotungstique et de résister à l'action des acides. On détermine d'abord sur 10 cm³ d'urine additionnés de 1/10 d'acide chlorhydrique à 10 % le nombre de centimètres cubes de solution d'acide phosphotungstique à 10 % nécessaire pour que le liquide, filtré après deux minutes, ne donne plus de précipité par l'acide phosphotungstique, puis on effectue cette précipitation sur 30 cm³ d'urine. Sur 10 cm³ du filtrat on détermine l'azote total par le Kjeldahl on a l'azote de l'urée + l'azote des amino-acides, sur 10 autres centimètres on détermine l'urée en les chauffant en tube scellé avec $\frac{1}{2}$ volume d'acide sulfurique concentré pendant trois à quatre heures à + 160° et + 180° et on distille en présence d'un excès de soude l'ammoniaque formée.

A. Levene et W. Beatty (5) ne précipitent les acides aminés qu'en solutions concentrées et par des dissolutions très concentrées du réactif. Les auteurs montrent quelles sont les conditions de précipitation du glycocolle,

(2) Ibid. t. 25 p. 179.

(3) Zeit. phys. ch. t. 31, p. 556-563 ; 21/2, 1901.

(4) Ibid. t. 30 p. 75.

(5) Zeit. phys. ch. 47, p. 149-150 ; 17/3, 1906.

de l'analine, de la leucine, de la phénylalanine et de l'acide glutamique et ils annoncent en outre un travail sur l'application de cette méthode à l'étude des diverses fonctions fournies par la méthode par éthérification de Fischer.

E. Schulze et E. Winterstein (1) traitent le liquide d'hydrolyse des matières proteiques par l'acide phosphotungstique et obtiennent un précipité. On admet en général que ce précipité ne contient que les bases hexoniques et que les acides monoaminés passent dans le filtrat. Les auteurs montrent que cela est vrai pour les solutions pures et suffisamment étendues. En solution à 5 % le glyocolle, la leucine active ou inactive, l'acide aminovalérianique et la tyrosine ne sont pas précipités, mais la phénylalanine se sépare sous la forme d'une huile qui cristallise au bout d'un certain temps.

A. Ignatowski (2), *E. Fischer* et *P. Bergell* (3).

L'urine est d'abord précipitée par l'acétate de plomb, filtrée, débarrassée du plomb par l'hydrogène sulfuré et de l'hydrogène sulfuré par une douce chaleur. On concentre à moitié dans le vide à 45°. On enlève, par des agitations avec 2 volumes d'éther des substances gênantes (acide hippurique etc.), puis on agite avec le chlorure de l'acide β -naphtalène sulfonique de la sonde jusqu'à réaction alcaline, par addition d'acide chlorhydrique on précipite l'acide naphtalène sulfo-aminé à l'état cristallisé.

L. Forssner (4).

(1) (Zeit. phys. ch. t. 33 p. 574-578 ; 31/10 1900).

(2) Zeit. phys. ch t. 42 p. 371-400 ; 17/8, 1904).

(3) (D. ch. G. t. 35 p. 3779).

(4) Zeit phys. ch. t. 47 p. 15-24 ; 10/2, 1906.

L'auteur a modifié de la manière suivante la méthode d'Ignatowski au chlorure de l'acide B-naphtalène sulfonique. Comme l'ammoniaque de l'urine donne avec ce réactif l'amide correspondante qui gêne la recristallisation des produits obtenus, il est bon d'éliminer préalablement cette base en concentrant dans le vide à 45° l'urine additionnée d'un lait de chaux, ou mieux encore d'ajouter au résidu d'extraction éthérée un peu d'eau et de l'ammoniaque jusqu'à faible réaction alcaline. Les sels ammoniacaux des combinaisons des amino-acides avec le réactif se dissolvent; tandis que l'amide reste insoluble.

Le rendement est médiocre, l'auteur n'obtient avec du glyocolle ajouté à l'urine que 26 à 30 %, il prétend en outre que le glyocolle étant l'acide aminé le plus fréquemment rencontré dans l'urine et qu'il apparaît dans l'urine chez des malades très différents, la recherche des amino-acides ne peut servir, comme on l'avait espéré au diagnostic de la goutte.

Abderhalden et Schittenhelm (1)

En traitant l'urine normale de l'homme par le chlorure de l'acide β naphtalène sulfonique, d'après E. Fischer et P. Bergel, en milieu faiblement alcalin, les auteurs ont pu retirer, mais non d'une façon constante, du naphtalène-sulfoglyocolle (0 gr. 212 de 10 lit.). En opérant en milieu fortement alcalin, comme l'ont proposé Embden et Reese (2), ils en ont retiré au contraire de 1 litre d'urine normale, dans six cas, de 0 gr. 05 à 0 gr. 33. Le glyocolle ainsi isolé n'est pas libre, mais copulé sous la forme d'une combinaison non précipitable

(1) *Zeit. phys. ch.* t. 47 p. 339-345 ; 25, 4, 1906.

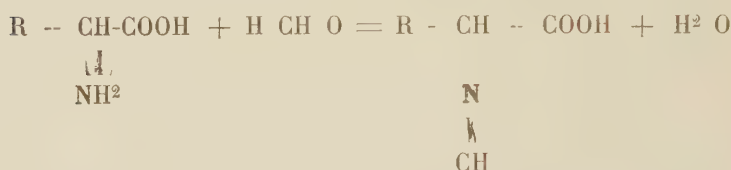
(2) *Beitr. chem. Physiol.* t. 7 p. 411.

par l'acide phosphotungstique, qui n'est pas l'acide hippurique et qui est dédoublée avec mise en liberté de glyccolcolle par la forte réaction alcaline mise en œuvre.

Les méthodes de Formoltitration

(SORENSEN-RONCHESE)

Principe. — Toutes ces méthodes reposent sur le fait suivant, trouvé par V. HUGO SCHIFF : les acides aminés, qui sont neutres vis-à-vis des indicateurs colorés, donnent avec le formol une combinaison méthylénique d'après l'équation ci-dessous :



Comme on le voit la fonction basique disparaît dans cette combinaison ; seule la fonction acide subsiste et peut alors agir sur les indicateurs colorés.

Il suffira donc d'ajouter à un acide aminé une solution de formol pour faire apparaître son caractère acide et on pourra ensuite le doser titrimétriquement comme un acide ordinaire ; tel est le procédé proposé par SORENSEN.

Mais d'autre part, il est facile de voir que la même réaction s'opère avec un sel ammoniacal suivant la formule suivante (DELEPINE, CAMBIER et BROCHET)



C'est-à-dire qu'il y a formation d'hexaméthylénetetramine et que l'acide est mis en liberté ; c'est sur cette réaction qu'est basé le procédé de dosage de l'ammoniaque de RONCHESE.

Dans l'urine, on trouve à la fois des sels ammoniacaux et des acides aminés ; si donc on fait le dosage par formoltitration sur l'urine telle qu'elle on obtiendra, non pas la teneur en acides aminés, mais un chiffre global représentant les acides aminés et l'ammoniaque.

Le but de toutes les méthodes proposées a donc été d'éliminer l'ammoniaque avant de pratiquer la formoltitration (1).

Méthode de de Jager (*Zeits. f. physiol.* 1909, LXII, 338)

On se débarrasse de l'ammoniaque par le phosphate de magnésie et on opère comme suit :

20 cm³ d'urine sont additionnés de 2 cm³ d'oxalate de potasse à 10 0/0 et de quelques gouttes de phénolphtaléine. On titre alors avec une solution de soude N/100 jusqu'à coloration rouge (A1).

On ajoute alors 40 cm³ de formol et on titre à nouveau (A2). La différence A2-A1 donne la totalité de l'azote aminé + l'azote ammoniacal.

On reprend alors 20 cm³ d'urine, on ajoute 2cm³ d'oxalate de potasse, 5 cm³ d'une solution de monophosphate de magnésie correspondante à 20cm³ de lessive N/100. On ajoute ensuite de la lessive de soude jusqu'à coloration rouge. On ajoute 4 cm³ de formol et on titre. La nouvelle valeur obtenue donne le taux des acides aminés. Par différence avec la valeur précédemment obtenue, on obtient le taux de l'ammoniaque.

Un procédé analogue a été repris par BrTH et vivement critiqué par LANZENBERG. Ce dernier auteur a montré en effet que l'insolubilisation de l'ammoniaque est très imparfaite.

Méthode de Henriques (*Zeits f. physiol. Ch.* 1099, LX, I).

A 50 cm³ d'urine on ajoute 1cm³ de phénolphtaléine à 0.5 0/0 et 2 gr. de BaCl₂ solide. On agite et on ajoute une solution saturée de baryte jusqu'à coloration rouge ; puis on ajoute encore 5 cm³ de solution de baryte (BaCl₂ et Ba (OH)₂ sont ajoutés ici pour enlever les phosphates). On amène le volume à 100 cm³, on laisse reposer quinze minutes ; on filtre sur filtre sec.

(1) Voir à ce sujet LANZENBERG. L'ammoniaque et l'urée, *Thèse de la Faculté de Médecine de Paris*, 1912.

80 cm³ de filtrat (qui représentent 40 cm³ d'urine) sont placés dans un ballon de 100 cm³ et amenés à 100 cm³ avec HCl N/5.

On prend 40 cm³ de cette solution (soit 16 cm³ d'urine) pour doser l'ammoniaque et 40 cm³ pour pratiquer la formoltitration.

Pour doser l'ammoniaque, on distille dans le vide après addition de Ba (OH)₂. L'ammoniaque est reçu dans H₂ SO₄ N/10 ; on dose avec l'hyposulfite de soude en prenant l'iodure d'amidon comme indicateur.

La formoltitration se fait à la manière habituelle. Elle donne une valeur global des acides aminés et de l'ammoniaque.

Par différence, on obtient la teneur en acides aminés.

Méthode de Malfatti (*Zeits. f. physiol. Ch.* 1909, LII, 199).

Le principe de cette méthode consiste dans l'enlèvement de l'ammoniaque par les sels de mercure.

A 50 cm³ d'urine, on ajoute de 2 à 4 gr. de chlorure de mercure et une petite quantité de carbonate de soude en poudre jusqu'à obtention d'une réaction alcaline au tournesol. On filtre, on ajoute au filtrat quelques gouttes d'acide acétique, on se débarrasse du mercure par H₂S et on enlève CO₂ et H₂S par passage d'air et ébullition. On pratique la formoltitration sur le liquide ainsi obtenu.

Méthode de Benedict et Murlin. (*Journ. of. Biol. Chemistry* ; 1913. XVI, 385).

Le principe de cette méthode consiste dans l'enlèvement de l'ammoniaque par l'acide phosphotungstique.

On mesure dans une fiole d'ERLENMEYER de 500 cm³, 200 cm³ d'une urine humaine de vingt-quatre heures, diluée à 2.000 ; on ajoute une quantité égale d'acide phosphotungstique à 10 0/0 dans HCl à 2 0/0 ; on laisse au repos pendant trois heures ou mieux une nuit.

On prélève 250 cm³ du liquide clair, on ajoute 1 cm³ de

solution de phénolphtaléine à 0.5 0/0 et de la baryte jusqu'à coloration rouge franche, on laisse reposer pendant une heure.

On filtre 100 cm³. On neutralise avec HCl N/5. On ajoute de 10 à 20 cm³ de formol neutre et on titre avec NaOH N/10.

Méthode de Lematte (*C. R. Soc. Biol.*; 1913, LXXIV, 280).

Dans un ballon gradué de 100 cm³, on introduit 30 cm³ d'urine et 50 cm³ d'une solution à 30 % d'acide phosphotungstique ; on agite, on laisse reposer dix minutes ; on ajoute 4 gr. de chlorure de magnésie ; on amène à 100 cm³ avec de l'eau distillée, on agite on laisse au repos pendant deux heures.

On reprend le surnageant clair, et on le filtre. On prend 50 cm³ du filtrat, on ajoute 10 gouttes de phénolphtaléine et 50 cm³ NaOH N. On laisse au repos une demi-heure et on filtre. On obtient un liquide A (rouge vif) dans lequel on détermine la teneur en acide aminé par le procédé suivant .

On introduit dans une éprouvette bouchée à l'émeri de 100 cm³, 60 cc. d'eau, 10 gouttes de phénolphtaléine et on ajoute goutte à goutte NaOH N/100 jusqu'à teinte rose pâle persistante. Cete coloration constituera la *teinte témoin*.

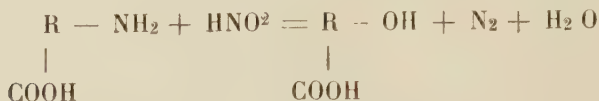
On prend alors d'autre part 66 cm³ 6 de la liqueur A (soit 10 cm³ d'urine) et on les place dans une éprouvette identique à celle précédemment employée. On ajoute alors H₂ SO₄ N/10 jusqu'à obtention de la *teinte témoin*. On ajoute alors 10 cm³ de formol neutralisé, puis goutte à goutte NaOH N/100 jusqu'à ce qu'on ait obtenu à nouveau la teinte témoin. Ce dernier chiffre correspond à la valeur des acides aminés.

II

Les méthodes à l'acide nitreux

Ces méthodes reposent sur le fait suivant : en faisant agir de l'acide nitreux sur un acide aminé, on libère l'azote du

groupement aminé. La réaction se fait suivant la formule ci-dessous :



Il suffira donc de doser l'azote dégagé pour pouvoir calculer la quantité d'acide aminé.

C'est sur ce principe qu'est fondé la méthode de VAN SLYKE (*Journ. of. Biol. Chem.*, 1911, IX, 185). Elle se pratique de la manière suivante : on place dans un flacon un mélange d'acide acétique et de nitrite de soude qui donne l'acide nitreux on introduit ensuite le liquide à doser, on agite et on recueille les gaz dans une cloche graduée ; on lave ces gaz à l'aide d'une solution alcaline de permanganate de potasse et on en lit ensuite le volume.

On peut opérer soit à l'aide de l'appareil proposé par VAN SLYKE, soit dans un uréomètre de DESGREZ et FEUILLÉ comme le proposent BIERRY, FEUILLÉ, HAZARD et RANC.

Cette méthode a été appliquée au dosage de l'urine par LEVENE et VAN SLYKE.

Méthode de Levene et Van Slyke. (*Journ. of. biol. Chemistri.* 1912, XII, 302).

1° *Détermination de l'azote aminé total (libre et conjugué)*

Dans un grand tube à essai on ajoute à 75 cm³ d'urine, 2 cm³ 5 d'acidesulfurique concentré ; le mélange est chauffé à l'autoclave à 175° pendant une heure et demie. On le place ensuite dans une fiole d'ERLENMEYER de 300 cm³ on ajoute 5 à 6 gr. de chaux et on porte à l'ébullition jusqu'à disparition de vapeurs alcalines ; on ajoute de l'eau pure au cours de cette dernière opération de manière à ne pas trop diminuer le volume.

On filtre sur filtre sec, on lave le précipité à l'eau chaude. Le filtrat est concentré au bain-d'eau et on dose par la méthode de van SLYKE.

2° Détermination de l'azote aminé libre.

On prend 50 ou 100 cm³ d'urine ; on y ajoute un volume égal d'alcool à 95° et de la chaux à 10 0/0 jusqu'à réaction fortement alcaline ; on distille ensuite le mélange jusqu'à enlèvement de l'alcool. On ajoute au résidu 2 à 3 cm³ d'acide acétique glacial qui dissout le tout et on ramène au volume initial (50 ou 100 cm³) avec de l'eau distillée. On pratique ensuite le dosage sur 10 cm³.

Observation importante sur la valeur à accorder aux résultats de ces méthodes (1).

« On ne devra en aucun cas, ni considérer aucune des valeurs obtenues par ces méthodes comme absolues, ni comparer entre elles les valeurs obtenues par les méthodes type SORENSEN à celles obtenues par les méthodes type VAN SLYKE.

En effet, comme ces auteurs eux-mêmes ont pris soin de l'indiquer la réaction est loin d'être quantitative avec tous les acides aminés.

Dans le cas de la formoltitration la lysine ne donne que 85.5 % de la valeur théorique, l'histidine 78 % ; la tyrosine et la proline donnent des résultats encore moins sûrs (SORENSEN).

Dans le cas du dégagement de l'azote aminé par traitement par l'acide nitreux, la proline, l'oxyproline ne réagissent pas, le tryptophane réagit avec la moitié de son azote, l'histidine avec un tiers, l'arginine avec un quart (VAN SLYKE).

Ainsi, il faut donc se garder de croire qu'on a en main, avec l'un ou l'autre des procédés, une méthode quantitative vraie d'évaluation des acides aminés. En réalité ni l'une ni l'autre des techniques (formoltitration, ou dégagement de l'azote aminé) ne donne une valeur exacte ; elles ne peuvent servir qu'à titre d'indications à l'intérieur de séries de recherches comparatives.

(1) Biologie Médicale 12^e année n° 4. Avril 1914.

On ne saurait en effet trop se garder de comparer entre elles les données obtenues par les deux méthodes et d'attribuer plus de valeur à l'une qu'à l'autre parce qu'on obtiendrait, dans certains cas, des valeurs plus élevées avec l'une qu'avec l'autre. C'est ainsi qu'en présence de lysine les résultats seraient plus élevés avec la méthode à l'acide nitreux qu'avec la formoltitration. Il serait facile de trouver des exemples de sens contraire. Ces méthodes n'ont donc aucune valeur absolue ».

CHAPITRE III

La tyrosine et les tyrosamines chez les êtres vivants

§ 1. CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

§ 2. LA TYROSINE DANS LES URINES

§ 3. LES TYROSAMINES DANS LES PRODUITS OPOTHÉRAPIQUES, LE LAIT, ETC.

§ I. Considérations générales

Après avoir exposé les réactions spécifiques de la tyrosine et des tyrosamines, après avoir indiqué, pour ces corps, une méthode de recherche précise et sûre, nous sommes armés pour entreprendre la poursuite et l'identification de la tyrosine et des tyrosamines dans les organismes vivants, végétaux et animaux, ainsi que dans les produits divers nés du fonctionnement même de ces organismes.

Nous attirons tout d'abord l'attention sur l'importance qu'il y aurait à rechercher les amino-acides et leurs amines dans les bouillons de culture microbiens. Nous pourrions ainsi trouver peut-être quelques rapports inconnus

jusqu'ici entre la présence des amines et la toxicité du bouillon de culture, et, partant de cette hypothèse qu'une toxine serait chimiquement une amine, en particulier une tyrosamine, nous ne serions point éloignés de croire que des recherches précises et minutieuses dans cette voie pourraient placer le grand problème biologique de l'intoxication sur le terrain chimique et vraiment scientifique qu'il n'aurait jamais dû quitter...

Nous espérons poursuivre un jour de semblables recherches, nous bornant à en indiquer aujourd'hui l'idée directrice.

Des recherches récentes ont montré que la tyrosine est un corps très répandu dans les organismes vivants. Chez les végétaux, les travaux de Pictet viennent de démontrer la transformation possible de la tyrosine en dérivés pyridiques, source d'alcaloïdes ; son importance n'est pas moindre pour la formation des mélanines et pigments colorés des deux règnes. Dans l'organisme animal nous retrouvons le noyau tyrosine dans l'adrénaline. La dégradation de l'iodothyrique amène l'obtention d'un peptide iodé riche en tyrosine, où l'iode se trouve probablement lié à un complexe tyrosinique ; les extraits d'hypophyse présentent les propriétés de la phenyléthylamine ; les pepsines fluides et la pancréatine (1) contiennent de la tyrosine cristallisée, les extraits hépatiques en contiennent également.

Causse (2) l'a isolée des eaux contaminées par des détritrus organiques.

La tyrosine étant très répandue, il faut admettre que les amines dérivées le sont également, c'est ce que nous

(1) DELOUNAY et BAILLY. Bull. sciences pharm. tome XIX n° 8 1912 p. 480

(2) H. CAUSSE. Académie des sciences 30 avril

avons vérifié ; le rôle, le métabolisme et les destinées de ces corps sont liés étroitement. On peut dire comme conclusion que partout où l'on trouve des tyrosamines, il y a ou il y a eu de la tyrosine, et sa recherche devient nécessaire, si l'on veut ne pas laisser dans l'ombre un des côtés de la question indispensable à connaître pour une appréciation certaine.

L'importance physiologique de ces corps est énorme, leur activité est particulièrement énergique, nous avons surtout recherché la p-oxyphényléthylamine. Ce corps a déjà été caractérisé dans les fermentations microbiennes des albuminoïdes, dans le vieux fromage d'Emmenthal (1), l'ergot de seigle, dans les digestions pancréatiques et pepsiques aseptiques (2), nous l'avons identifié dans les produits thérapeutiques des glandes à sécrétions internes, (thyroïde, ovaire, glandes mammaires etc..), dans les diastases digestives : pepsine, pancréatine et leurs produits de digestion (peptones), dans les liquides de l'organisme : crachats à albumino-réaction positive ou à pullulation microbienne abondante, dans l'urine normale en petite quantité, dans les urines pathologiques à dose plus élevée. Nous ne l'avons jamais trouvé dans le sang humain, même dans celui prélevé chez des azotémiques.

§ 2. La tyrosine dans les urines.

Dans le tableau ci-joint, nous avons réuni les résultats obtenus avec des urines émises soit par des personnes en

(1) ELLINGER. Zeit. phys. ch. t. 29 p. 334.

(2) EMMERSON et LANGSTEIN déjà cités.

ANALYSES D'URINE

Noméros	NOMS	Densité	REACTION	Test rapide perforable	Nombre d'indicateurs par litre	Diazoréaction	TYROSINE en 24 h.	Indosé par 24 h.	Albumine	SUCRE	OBSERVATIONS
6.634	M ^{me} H.	1.013	franç ¹ acide	6.66	20.40	orange	50 millig.	7 gr 80	0	0	Polyurie
6.666	M. T.	1.013	franç ¹ acide	6.49	22.20	jaune	15	17	0	10.55	Polyurie
6.668	M. D.	1.010	hyposacide	6.71	20	jaune	20	7	traces ∞	0	Polyurie
6.730	M. D. de C.	1.032	très acide	6.28	27	orange	75	18	traces ∞	0	très pygmentée
6.587	D ^r D.	1.010	hyposacide	7.14	41.23	orange	10		traces ∞	0	un peu de pus
6.589	N ^{me} G.	1.025	hyperacide	6.46	22.70	jaune	60	15	0	0	riche en ac. urique
6.601	Abbé G.	1.030	hyperacide	6.65	20.82	jaune	50		0	0	riche en ac. urique
6.420	D ^r B.	1.012	hyposacide	6.90	17.80	jaune	15	4	0	0	pauvre en ac. uri.
6.632	N ^{me} D. de C.	1.018	hyposacide	6.81	19	jaune	30	28	0	5	polyurie
6.633	N ^{me} J.-M.	1.022	franç ¹ acide	6.72	20.40	jaune	60	6	0	0	oligurie
6.640	N ^{me} O.-H.	1.012	franç ¹ acide	7.02	13.70	jaune	5	2	0	0	
6.641	M ^{lle} K.	1.022	franç ¹ acide	6.39	23.8	jaune	30	16	0	0	
6.654	N ^{me} M.	1.016	franç ¹ acide	7.02	13.70	jaune	20	10	0	0	hyperchlorurie
6.665	N ^{lle} de N.	1.015	hyperacide	6.26	27.8	orange rouge	70	15	traces ∞	0	très colorée
6.818	M. D.	1.008	lég ¹ acide	6.90	17.80	jaune	10	6	traces ∞		polyurie légère
6.517	M. S.	1.022	acide			jaune	120	60	traces ∞	46	polyurie
6.518	M ^{me} P.	1.016	acide			jaune	45	12	0		
6.519	M ^{me} F.	1.018	acide			jaune	15	15	traces ∞		oligurie légère
6.522	M. V.	1.020	acide			jaune	80	10	traces ∞		polyurie
6.801	M. G.	1.016	lég ¹ acide			orange rouge	120		0.15		

bonne santé, soit par des diabétiques ou des malades très légèrement albuminuriques.

Certes, nos résultats, trop peu nombreux, ne sauraient nous permettre d'avancer ici de façon certaine une théorie générale inébranlable. Cependant nous envisageons déjà la possibilité d'un rapport constant entre la teneur en tyrosine et tyrosamines et la toxicité urinaire.

On remarquera dans notre tableau à côté du chiffre exprimant la teneur en tyrosine, l'évaluation des urotoxîes calculées par le procédé de Perrin, de Clermont-Ferrand : on sait que ce procédé consiste à établir une relation absolue entre la tension superficielle déterminée à l'aide de la pipette de Duclaux et la toxicité des urines telle que l'indique le procédé de Bouchard. Ainsi que l'avait constaté Amann, nous pensons que la tension superficielle d'une urine est étroitement liée à l'élimination des purines, urobiline et pigments biliaires. Malgré tout l'attrait que présente un procédé aussi simple, aussi cliniquement appréciable que celui de Perrin, nous n'hésitons pas à conclure qu'il faut chercher ailleurs un moyen d'évaluer la toxicité urinaire. Nous avons pensé, pour ce faire, au rapport possible existant entre la quantité de tyrosine et de son amine d'une part et le degré d'intoxication organique d'autre part.

Les recherches suivantes sembleraient apporter à notre manière de voir tout le bénéfice d'une base scientifiquement établie.

Brieger a montré que différentes amines toxiques se forment sous l'influence des bactéries de la putréfaction agissant sur les protéiques. Ces substances formées dans l'intestin pénètrent dans le milieu interne et l'empoison-

ment. A cette classe appartient notamment la paraoxyphényléthylamine.

Emmerson trouve ce dernier poison dans l'autolyse du pancréas.

Berger et Wolpole le rencontre également dans la putréfaction de la viande de cheval.

Berthelot et Bertrand établissent que le bacillus aminophilis intestinalis forme de la paraoxyphényléthylamine à partir de la tyrosine.

Sasaki montre la formation de cette amine aux dépens de la tyrosine sous l'influence de bacilles coli et il ne s'agit pas d'une formation de traces de ce poison, mais de quantités considérables. Il obtient, à partir de 10 gr. de tyrosine, 5 gr. 96 de paraoxyphényléthylamine c'est-à-dire 78,7 % du rendement théorique.

Les expériences récentes de *T. Iwao* confirment notre hypothèse : en étudiant expérimentalement le poison que le coli bacille forme au dépens de la tyrosine produit naturel de la transformation des protéiques dans l'organisme animal, il fait ses expériences sur des cobayes auxquels il injecte sous la peau des quantités croissantes de paraoxyphényléthylamine. Dans toutes ces expériences, les animaux présentent des symptômes d'anémie pernicieuse.

Le nombre des globules rouges et la teneur totale en hémoglobine diminuent considérablement, par contre, les érythrocytes isolés sont encore relativement riches en hémoglobine. Les leucocytes éosinophiles diminuent beaucoup et on observe ensuite l'apparition de la polychromatophilie des normoblastes et des macrophages, le nombre de lymphocytes augmente relativement. L'auteur conclut que la paraoxyphényléthylamine produit des modifica-

tions profondes dans les éléments sanguins, se rapprochant de celles observées dans l'anémie chez l'homme.

Ce poison formé dans l'intestin passera dans l'urine par un mécanisme analogue, par exemple, à celui de l'indol et du scatol, lié à un radical acide et grâce à nos procédés il nous sera permis d'en suivre l'élimination et d'en noter les variations. Pour nous, soucieux de ne point nous éloigner des faits et craignant le domaine toujours fascinant, mais combien dangereux de l'hypothèse, nous nous bornerons à tirer ici une conclusion du tableau ci-contre : *la tyrosine est un produit normal de l'urine humaine.*

§ 3. Les tyrosamines dans les produits opothérapiques, le lait etc.

5 gr. de substance sont mis à macérer dans 80 cm.³ d'eau acidulée à 10 gr. d'acide chlorydrique pour 1.000. Après 2 heures de contact la liqueur surnageant est décantée et traitée par le sulfodiazobenzol. Les couleurs obtenues sont classées par importance du rouge dans le jaune rouge ; la coloration la plus forte a été rencontrée dans la glande mammaire, couleur à laquelle nous avons donné le coefficient 4 le plus élevé.

Glandes mammaires	Testicules	Cervelle	Ovaire	Rein	Thyroïde	Hypophyse	Rate	Substance grise	Foie	Polyglandine	Surrénale
Diazo-réaction jaune rouge 4	jaune Rouge 3	jaune rouge 3	jaune rouge 3	jaune rouge 2	jaune rouge 2	jaune rouge à peine sensible	0	0	0	0	diazo spéciale rouge vineux prononcée mais fugace en résumé diazo de l'adrénaline

Nous constatons que la richesse en tyrosamines dans ces produits s'établit comme suit par ordre décroissant :

glandes mammaires, testicules, cervelle, ovaire, rein, thyroïde, hypophyse. Les surrénales donnent avec intensité la diazo-réaction de l'adrénaline. La substance grise, le foie et les ganglions ne contiennent pas traces de tyrosamines. Nous déterminerons dans la suite si ces corps contiennent de la tyrosine et en quelle quantité, nous extraierons également les tyrosamines à l'état d'azoïques cristallisés. Nous ne croyons pas que les tyrosamines aient été déjà signalées dans ces produits. En multipliant nos investigations, nous pourrons ainsi expliquer la similitude, prévoir l'intensité et le sens d'action physiologique de certains de ces produits.

Recherches des tyrosamines dans le lait de vache.

DATES		DIAZORÉACTION
31 avril	Lait frais.	orange rouge
1 ^{er} mai	Le lait précédent est conservé à la Température de + 17° le lait est inaltéré.	orange rouge moins intense que précédemment
2 mai	T = + 18° le lait commence à cailler réaction acide	orange rouge, même intensité que le 1 ^{er} mai
3 mai	T = + 18° lait caillé réaction acide	orange rouge, même intensité que précédemment
4 mai	T = + 19° lait altéré réaction neutre	orange pâle c. à d. diazoréaction négative
8 mai	T = + 17° lait très altéré réaction alcaline	orange rouge plus intense que le 1 ^{er} avril
10 mai	lait putréfié réaction alcaline	rouge franc.

En résumé, la marche de ces réactions est la suivante : le lait normal frais contient des tyrosamines ; pendant le travail de la fermentation lactique, la réaction diminue d'intensité, puis devient négative. La réaction alcaline succédant à la réaction acide, le travail de putréfaction s'installe, il y a production de tyrosamine au détriment de la caséine riche en tyrosine.

Cette expérience demande à être reprise de la façon suivante : il sera nécessaire pour s'assurer de la fraîcheur du lait d'assister au trayage de l'échantillon à examiner,

de procéder, journellement, comme nous l'avons fait, aux réactions. Après quelques jours du travail microbien, de la fermentation lactique, il faudra détruire les micro-organismes par la chaleur et enfin ensemercer avec du putrificus par exemple.

Nous nous réservons de poursuivre ces expériences et nous espérons pouvoir en tirer un jour quelque déduction intéressante au point de vue de la pathologie générale. Concluons aujourd'hui à l'existence d'acides aminés aromatiques dans le lait frais. A notre connaissance, c'est là un fait qui n'avait été signalé, jusqu'ici, par aucun auteur.

PEPTONES

Les peptones traitées, comme nous l'avons indiqué, soit par la méthode de A. Gautier, soit par notre méthode, donnent un produit soluble dans l'alcool amylique, insoluble dans l'éther, non précipitable par l'acétate de plomb. Ce produit donne une diazo-réaction franchement positive ; on peut le caractériser par notre méthode : on obtient un azoïque cristallisé ayant les caractères micrographiques de la paraoxyphényléthylamine.

Ce corps a d'ailleurs été déjà isolé des digestions pancréatiques et pepsiques prolongées par Langstein et Emerson et la description de ses propriétés nous porte à croire que le corps décrit par Brieger sous le nom de peptoxine est fourni par de l'oxyphényléthylamine impure.

La pancréatine extractive ou la pancréatine desséchée (signalons en passant la présence de tyrosine cristallisée dans ces produits), la pepsine extractive ou la pepsine desséchée donnent également les mêmes réactions que les peptones.

Nous poursuivrons la formation des azoïques caractéristiques dans ces produits.

CHAPITRE IV

Formation des amines cycliques ⁽¹⁾

L'importance considérable prise actuellement par les acides aminés dans les phénomènes biologiques n'est plus discutable ; il nous a paru intéressant d'envisager un des côtés les moins connus de la question, c'est-à-dire la transformation des amino-acides en amines.

Nous nous sommes cantonnés, dans nos recherches, aux amines aromatiques, qui, à notre avis, ont un rôle plus important et plus précis que les amines grasses.

Les acides aminés produits par l'altération hydrolytique des protéines sont susceptibles de se transformer par 3 processus bien différents :

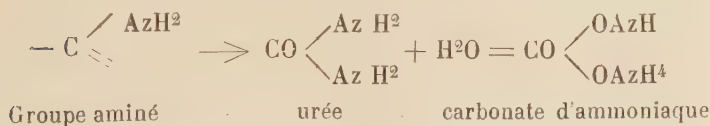
I. par oxydation et hydrolyse,

II. par désamination,

III. par décarboxylation,

envisageons successivement ces trois modes de transformation

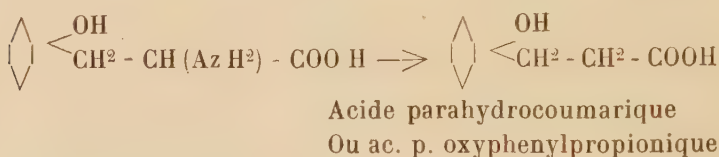
1° *par oxydation et hydrolyse*. — Nous obtiendrons :



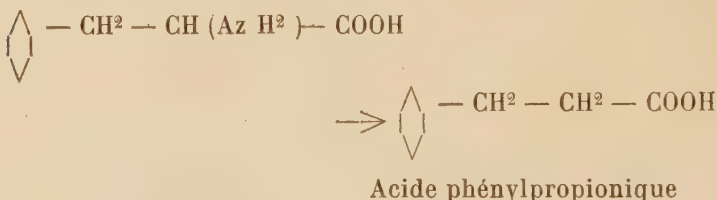
(1) PELLISSIER et CHARDET C. R. Soc. Biologie Nancy, juillet 1914.

pour expliquer cette formation il faut admettre la fixation d'oxygène au carbone et la soudure d'un groupe Az H₂ sur l'atome de carbone. Cette formation a été démontrée par Hofmeister en oxydant les amino-acides par le permanganate de potasse en présence d'ammoniaque.

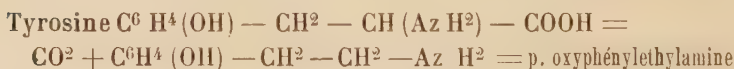
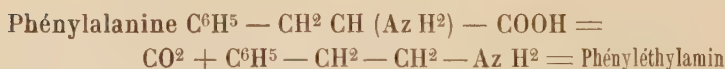
2° *Par désamination.* — La tyrosine par exemple donnera :



et la phénylalanine :



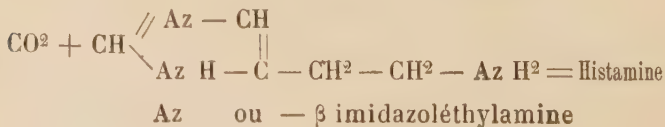
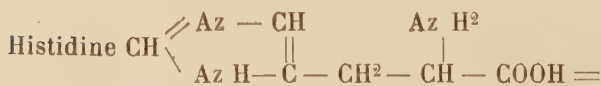
3° *par décarboxylation.*



Acide aminé inconnu =



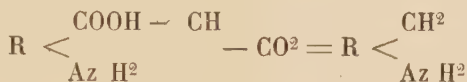
Acide aminé inconnu =



De ces trois processus, la décarboxylation seule donnera naissance aux amines que nous étudions plus spécialement ; par quel processus biochimique précis ce phénomène se produira-t-il ? Nous n'osons émettre d'hypothèse.

Pendant longtemps on a admis la formation exclusive des cyclo-amines dans les processus de putréfaction, en se basant sur les travaux de Gautier et d'Etard et d'après cette loi établie par eux : la putréfaction se manifeste par des phénomènes de désamination et de décarboxylation.

Le mécanisme est le suivant dans le cas des acides aminés.



le groupement acide est détruit et l'on a la fonction amine libre, la saturation intra-moléculaire due au groupement acide n'existant plus.

Les recherches d' *Emmerson* (1) et de *Langstein* (2), nous ont démontré d'une façon indiscutable la formation d'amines en dehors de toute action microbienne, dans les digestions pancréatiques et pepsiques aseptiques.

Le nombre des acides aminés aromatiques connus est bien limité, tellement qu'il donnerait à penser que les amines qui en dérivent sont d'importance faible ; mais leur rôle prend quelque ampleur avec la découverte de l'adrénaline, de l'hordénine de l'histamine, de l'éphédrine, tous corps formés par des fonctions cellulaires de tissus animaux ou végétaux. Il faut joindre à ces bases les

(1) Beitr. chim. phys. u. Path. t. 1, p. 501-506 ; 1/1902.

(2) Ibid. t. 1, p. 507-523 ; 1/1902.

amines retirées par Gautier des foies de morue et rangées par lui dans les tyrosamines ; l'une de ces bases est formée par la paraoxyphényléthylamine.

Notre chimiste M. Gaston Chardet dans un travail intitulé : Le chimisme des sols, évolution des acides aminés et publié dans la Revue de chimie pure et appliquée (T. XVII n° 9, 10 mai 1914), nous montre que l'azote protéique, incapable d'être assimilé directement par les plantes qui n'ont pas comme l'animal, la possibilité de faire subir à leurs aliments un travail de digestion préalable, devront le recevoir sous la forme soluble et assimilable. Les protéiques subissant l'hydrolyse microbienne donneront des acides aminés et parmi ceux déjà trouvés nous relevons les amino-acides aromatiques : tyrosine, phénylalanine, histidine.

Ces produits du sol, dit-il, ont une origine endogène, formés au sein même du sol à partir des protéines ; mais ces corps en solution pure sont toxiques pour les végétaux, aussi doivent-ils être transformés, par les processus naturels, pour être utilisés peut-être à l'état d'amines par les végétaux dans lesquels on les retrouve.

Nous ne saurions mieux faire pour montrer l'importance des amino-acides et leurs amines que de citer rapidement les travaux des savants qui en ont démontré l'existence.

Abderhalden, Rostocki trouve des amino-acides dans l'action protéolytique du suc gastrique, mais en petite quantité ; leur production est tardive .

Kähne montre que le travail trypsique produirait rapidement une dégradation profonde de la molécule pro-

téique et c'est dans l'espace de quelques heures que la tyrosine s'en sépare.

Kutscher et Seeman les identifient dans le chyme intestinal ; leur ordre d'apparition est sensiblement le même que dans les digestions artificielles.

Dans certains cas pathologiques, atrophie aiguë du foie intoxication par le phosphore, fièvre typhoïde, variole grave, cystinurie, alcaptonurie, on trouve des amino-acides, de la tyrosine ou le dérivé tyrosinique, acide homogentisique.

Pellissier (cas non publié) : nous avons trouvé de la tyrosine cristallisée en grande quantité dans un sédiment urinaire muqueux. Ce mucus emprisonnait en outre de petits calculs uratiques et oxaliques, de nombreux bacilles de Koch et des globules sanguins. L'urine contenait une petite quantité de tyrosamines et 120 milligrammes de tyrosine dissoute.

H. Malfatti (1) a repris les travaux de Hoppe-Seyler qui admettait la présence des amino-acides dans les digestions pepsiques alors que Kuhn et Neumeister prétendaient que l'action de la pepsine s'arrêtait aux peptones. L'auteur trouve du tryptophane et indique le procédé qui lui sert pour rechercher les acides aminés et les bases précipitables dans la peptone de Witte (acide phosphotungstique).

Jacoby (2) : un extrait de poumon de porc, frais et thyroïdolyse, puis abandonné à 37°, contient au bout de 10 à 20 jours de la leucine et de la tyrosine.

V. Ducceschi (3) trouve de la phénylalanine dans l'hydrolyse des matières protéiques par l'acide chlorhydrique.

(1) Zeit. phs. ch. t. 31 p. 43-48 ; 25/11 (1910).

(2) Zeit. phys. ch. t. 33 p. 126-127 ; 7/8 (1911).

(3) Beitr. chem. Phys. u. Path. t. 1 p. 339 346 12/1901.

K. Spiro (1) signale la présence de phényléthylamine dans les produits de putréfaction pancréatique de la gélatine.

Le résultat de nos recherches nous donne à penser que, dans son expérience, l'auteur a décelé de la phényléthylamine apportée par le suc pancréatique.

Schmidt-Nielsen (2) :

Les muscles de poissons présentent, comme la chair et les organes des mammifères, le phénomène d'autolyse décrit par *Salkowski*.

L'auteur étudie la marche de cette autodigestion sur le hareng salé. Il passe dans la saumure une certaine quantité d'azote aminé provenant d'amides, des amino-acides et des bases puriques. Les bactéries ne prennent point part à cette opération, ce qui distingue nettement ce phénomène de celui de la maturation du fromage.

O. Cohnhein (3) : La tyrosine se produit en présence de la diastase protéolytique du foie.

La tyrosine n'aurait pu être caractérisée dans le sang.

A. Ignatowski (4) : L'urine normale ne contient que des traces d'amino-acides, même après injection sous-cutanée de 6 gr. de glycocolle. Au contraire dans 7 cas de goutte on a trouvé régulièrement du glycocolle, accompagné, dans 3 cas, d'autres amino-acides, probablement de la leucine et de l'acide aspartique. Mêmes résultats dans les cas de pneumonie (au moment de la crise) et de leucémie.

(1) Beitr. chem. Phys. u. Path. t. 1 p. 347-350 ; 12/1901.

(2) Beitr. chem. phys. u. path. t. 3 p. 266-276 ; 11/1902.

(3) Zeit. phys. ch. t. 35 p. 396-415 ; 17/6 1904.

(4) Zeit. phys. ch. t. 42 p. 371-400 ; 17/8 1904.

O. Schumm (1) : Une rate leucémique abandonnée à l'autolyse pendant 3 mois a fourni les produits d'hydrolyse que voici : guanine, xanthine, hypoxanthine, histidine, lysine, d-alanine, l-leucine, l-tyrosine, thymine, ac-paralactique et ammoniacque. Manquaient l'adénine et l'arginine. L'autolyse de la rate leucémique va donc plus loin que celle de la rate normale.

E. Abderhalden et Schittenhelm (2) : L'urine d'un cystinurique contenait, à côté de la cystine, de la tyrosine, isolée par cristallisation et de la tyrosine séparée sous la forme de sa combinaison B. naphtalène sulfonique. De plus en plus la cystinurie apparaît donc comme une anomalie des échanges nutritifs azotés portant non pas uniquement sur l'un des fragments de la désintégration des protéïques, la cystine, mais sur l'ensemble des amino-acides résultant de cette désintégration.

S. London. (3) : On trouve les amino-acides (leucine, tyrosine, lysine et arginine, alanine, ac. aspartique) par la méthode par éthérification de Fisher, dans les matières fournies après un repas de viande par une fistule intestinale, établie au milieu de l'intestin grêle chez un chien.

F. Samuelly (4) discute et contrôle pas à pas toute la technique de l'extraction des acides aminés de l'urine sous la forme de B-naphtalène-sulfo-dérivés. Il rapporte ensuite que l'urine normale contient, d'une manière constante du glyocolle (indépendamment de celui de l'ac. hippurique) et discute les résultats fournis par un certain nombre d'urines pathologiques en ce qui concerne le rendement total en sulfodérivés d'acides aminés

(1) Beitr. chem. Phys. u. Path. t. 7, p. 175-203 ; 10/1905

(2) Zeit. phys. ch. t. 45 p. 468-472 ; 20/8 1905.

(3) Zeit. phys. ch t. 47 p. 368-375 ; 25/4 1906.

(4) Zeit. phys. ch. t. 47, p. 376-390 ; 25/4 1906.

Wiéner (1) signale la présence des acides aminés et de la tyrosine dans un exsudat provenant d'un malade atteint de carcinome.

L'histidine, l'arginine et la leucine peuvent être isolés après séjour à l'étuve.

La tyrosine a été isolée par cet auteur d'un liquide d'ascite après digestion.

P. Henze (2) trouve la p. oxyphényléthylamine dans la salive des céphalopodes. Cette sécrétion provoque la paralysie des crustacés et il en attribue l'action à cette base.

Au cours de ce travail nous avons écrit à de nombreuses reprises les tyrosamines et non la tyrosamine. C'est que nous avons la certitude que nous nous adressons à une classe de corps dont la tyrosine est le représentant le plus connu. Le professeur A. Gautier a prévu, dans son enseignement, l'existence d'homologues de la tyrosine par exemple ceux en C8 et C10. La découverte de la ratanhine ou méthyltyrosine en est une preuve. La chimie est riche en ressources ; elle découvrira ces amino-acides et leurs amines.

(1) Bioch. Zeitschr. t. 41, p. 149-157 ; 1912.

(2) Zeit. f. Physiol. ch. t. 87, p. 51-53 ; 8/1913

CHAPITRE V

Régression des acides aminés dans l'organisme

Si, dans notre travail, nous croyons devoir aborder cette question de pure physiologie, c'est que nous estimons apporter, à l'aide de nos procédés de recherche, quelques faits scientifiquement établis en faveur d'hypothèses encore assez fragiles.

Les différents sucs digestifs scindent la molécule albuminoïde complexe en ses acides aminés constitutifs et de formule plus simple ; leur rôle est avant tout analytique. Mais ce n'est là qu'un premier travail, une préparation à l'absorption, à l'utilisation intra-organique et à la reconstitution des albumines spécifiques nécessaires à la vie. Cette autre partie du travail, la plus importante, à vrai dire, est aussi la plus mal connue. Où s'accomplit-elle ? Quel est l'organe chargé de trier parmi les corps que lui apporte l'hydrolyse digestive les matériaux nécessaires à la construction d'une molécule albuminoïde semblable à celle de l'organisme et directement utilisable par lui ? Tour à tour et suivant les auteurs, le foie, le sang, la paroi intestinale ont été incriminés ; la question reste ouverte.

Abderhalden et Samuely accordent à l'intestin ce grand rôle de synthèse, non que dans la muqueuse s'édifieraient des albumines diverses identiques à celles des divers tissus, mais il se produirait une sorte d'albumine neutre directement assimilable, la spécificité se complétant là où l'utilisation a lieu. Ce mécanisme mettrait l'organisme à l'abri de variations causées par la variété de l'apport alimentaire, chaque cellule puisant dans le milieu interne la même molécule protéique neutre.

Une conséquence physiologique nécessaire découle d'une telle théorie : plus une albumine ingérée sera différente de l'albumine constituant l'organisme, plus la quantité de produits excrémentiels non utilisables sera considérable ; ainsi pour un être vivant l'alimentation la plus économique, biologiquement parlant, parce que la plus largement utilisée, sera sa propre albumine, pour l'homme : l'anthropophagie. Et de fait Magnus Lévy remarque qu'au début de leur développement les oiseaux ne reçoivent que l'albumine de leur œuf et les mammifères que l'albumine de leur lait. Le nouveau-né fixe ainsi presque toute l'albumine qu'il absorbe, 73 à 85 % suivant les uns, 77 à 89 % suivant les autres (Michel, Soxhlet). Les albumines ingérées étant proches des albumines édifiées, les déchets sont réduits au minimum ; la machine vivante actionnée par un combustible idéal fournit un rendement considérable.

Or, nos expériences ont prouvé que dans le lait frais, ou plus exactement dans le lait tel qu'il est livré à la consommation parisienne, il y a des tyrosamines et que celles-ci existent en beaucoup plus grande quantité dans la glande mammaire elle-même. Sans aucun doute ces tyrosamines proviennent de la tyrosine. Mais où et com-

ment s'est opéré la décarboxylation ? Sont-ce là des produits albuminoïdes apportés tels quels dans la glande ou apparaissent-ils à la suite d'une dislocation post mortem de la caséine riche en tyrosine ? Nous n'avons point encore résolu le dilemme. Cependant les tyrosamines paraissent bien être tout autre chose qu'un produit de décomposition, apparaissant après la mort ; au cours de la vie même ou dans des produits opothérapiques obtenus par dessiccation de glandes fraîches, nous avons pu déceler leur présence : 10 gramme de poudre de testicules desséchés en macération pendant deux heures dans de l'eau acidulée à 10 grammes pour 1.000 d'acide chlorhydrique nous donnent, après filtration, une solution avec laquelle on obtient une diazoréaction orange rouge très appréciable. Bien plus, du sperme fraîchement émis fournit une diazo-réaction impressionnante. Avec la poudre d'ovaires, la diazo-réaction est plus intense encore.

Ne pourrait-on voir dans de pareils faits l'explication des constatations physiologiques que nous signalions tout à l'heure ? L'œuf fécondé ne poursuivrait-il point son évolution azotée, ne forgerait-il sa charpente protéique aux dépens des amines acides préformés par les générateurs et la valeur de l'alimentation autophagique n'est-elle pas en grande partie, sinon tout entière, dans ces mêmes amines acides qui font partie essentielle de la chair ingérée ?

Quelle que soit la réponse que l'avenir réserve à ces questions passionnantes, il semble bien qu'aujourd'hui il ne soit point téméraire d'admettre que l'organisme vivant est en mesure de former de toutes pièces de la tyrosine et des tyrosamines, et de plus il apparaît que ces corps

forment une partie essentielle de leur édifice albuminoïde.

D'autres recherches viennent corroborer nos dires en ce qui concerne les acides aminés en général ; nous en ferons un rapide exposé :

E. Abderhalden et P. Roma (1). Après injection de 15 grammes de glycocollyl-tyrosine sous la peau ne retrouvent pas ce composé dans l'urine pendant les 7 jours suivants l'injection, pas plus d'ailleurs que les deux acides aminés composants.

K. Stoltz (2). Les divers amino acides introduits dans le sang agissent différemment sur la composition de l'urine.

I. Tyrosine, phénylalanine, n'augmentent l'urée que d'une façon douteuse.

II. Alanine, ac. aspartique et glutamique augmentent à la fois la quantité d'urée et celle de l'azote des monamino-acides.

III. Glycocolle et sans doute leucine, augmentent l'urée d'une manière durable et l'azote monoaminé très transitoirement et seulement quand on inonde l'organisme par ces aminos-acides.

E. Abderhalden et Kantzsch (3). Le d-l-leucyl glycocolle injecté sous la peau chez le lapin se trouve en partie dans l'urine lorsque la quantité introduite est égale à 4 gr. 50, tandis que 4 gr. disparaissent complètement.

Per os 5 gr. 50 sont détruits.

(1) Zeit. phys. ch. t. 48 p. 176-178 ; 12/10/1905.

(2) Beitr. z. chem. phys u. Path. t. 5 p ; 15-26 ; 12/1903.

(3) Zeit. phys. ch. t. 48 p. 557-561 6/9 1906.

5 gr. de d-l-leucyl-glycocolle-glycocolle injectés sous la peau n'ont donné lieu qu'à une faible élimination du glycocolle. Visiblement ce tripeptide est complètement détruit.

E. Reiss (1) fait prendre per os 6 grammes de l-tyrosine à une chienne de 4 k. 500, ils sont presque entièrement détruits, l'urine n'en élimine vraisemblablement qu'une petite quantité.

Chez l'homme 10 grammes ne représentent pas la limite de tolérance et pour cette dose, rien ne passe dans les urines. 6 gr. de l-leucine chez un chien donne le même résultat. 11 gr. de d-alanine chez l'homme sont complètement détruits ; quant au racémique la partie droite disparaît complètement et la partie gauche se retrouve en partie dans les urines.

Embden et Reese (2) ont trouvé une quantité assez notable d'ac-aminés dans l'urine.

M. Plaut et H. Reese (3). L'alanine racémique introduite chez le chien par os ou sous la peau reparait en partie dans les urines à l'état d'alanine droite. Le maximum retrouvé a été de 2 gr. 83 pour 15 gr. d'alanine ingérée. Chez l'homme on a trouvé 18 gr. 10 sur 50 gr. ingérés et dans un autre essai 6 gr. sur 11 gr. soit donc beaucoup plus que chez le chien.

E. Abderhalden et F. Samuelly (4) ont observé comme *Wohlgemuth* (5) que la leucine racémique n'est qu'à

(1) Beitr. chem. phys. u. path. t. 8 p. 332-333 ; 7/1906

(2) Beitr. chem. Phys. u. Path. t. 7 p. 411 ; 11/1905.

(3) Beitr. chem. Pyhs. u. path. t. 7, p. 425 432 11/1905.

(4) Zeit p c. t. 47 p. 346-353 ; 25/4/1906.

(5) D. ch. G. t. 38 p 2064.

moitié détruite par l'organisme du lapin et que 50 à 60 % de la d-leucine calculée apparaissent dans l'urine.

Chez le chien au contraire, l'urine n'élimine en général, dans ces conditions, que des traces de leucine. Pareillement la leucyl-leucine, que le suc intestinal activé n'attaque pas, ne produit aucune élimination par les urines, ni du peptide inaltéré, ni de la leucine.

E. Abderhalden et B. Babkin (1). Le leucyl-glycocolle peptide qui n'est pas dédoublé par le suc pancréatique du chien est complètement détruit chez cet animal quand on l'introduit per os. L'urine ne contient pas d'acides pouvant être isolés à l'état de B-naphtalène-sulfo-dérivés. L'azote et l'urée sont augmentés en quantité.

S. Salaskin et Kuth-Kowalesky (2). Après injection intra-veineuse de glycocolle dans l'organisme du chien, ces auteurs constatent que l'injection est suivie d'une augmentation d'ammoniaque dans cette humeur. Elle se débarrasse rapidement de l'acide dont la majeure partie est cédée aux tissus et le reste à l'urine. Le fait qu'on ne retrouve pas ce glycocolle dans les tissus, et, d'autre part l'augmentation d'ammoniaque dans le sang et celle de l'urée dans l'urine, permettent de conclure que le glycocolle a été transformé en AzH_3 (carbonate ou carbamate), puis en urée.

Ch. E. Simon (3). La tyrosine ingérée par un cystinurique reparait à peu près quantitativement dans les urines et en admettant que ce phénomène soit commun à tous les cystinuriques, les auteurs ont considéré cette

(1) Zeit. phys. ch. t. 47 p. 391-393 ; 25/4/06.

(2) Zeit. phys. ch. t. 42 p. 410, 414 ; 17/8/1904.

(3) Zeit. phys ch t 45 p 357-358 ; 29/8/1901.

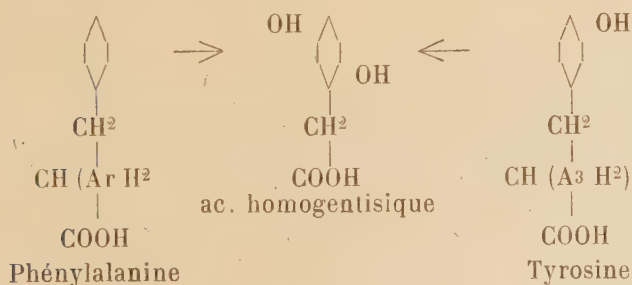
affection comme caractérisée par un trouble général des échanges nutritifs portant sur les amino-acides.

Læwy et Neuberg (1) rapportent le cas d'une cystinurie chez laquelle l'ingestion de 4 à 5 gr. de tyrosine n'était suivie d'aucune excrétion de ce corps par les urines durant les 36 heures suivantes.

Blendermann (2). Après ingestion de tyrosine constate l'élimination de ce corps par l'urine à l'état de tyrosine-hydantoïne.

Kirk, L. Garnier et Voisin prétendent que la tyrosine et la phénylalanine passeraient normalement par l'acide homogentisique. Chez l'homme bien portant ces acides seraient détruits au moment de leur formation, en cas de trouble et en particulier dans l'alcaptonurie, la dégradation s'arrêterait au stade de l'acide homogentisique.

L. Blum l'a représenté ainsi :

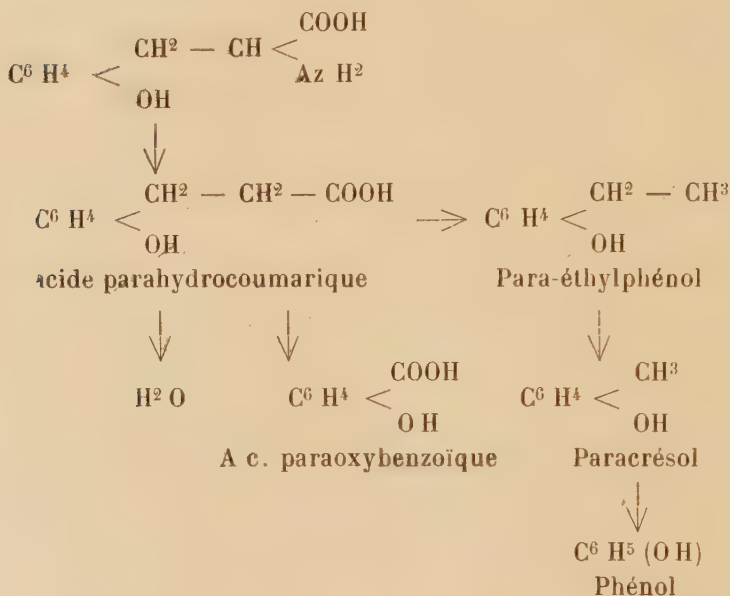


Au point de vue chimique, il n'y a rien de surprenant, mais pour confirmer cette transformation physiologique, il serait nécessaire de constater la présence de cet acide dans l'économie.

(1) Ibid. t. 4A p. 338.

(2) Zeit. phys. ch. VI p. 253

Baumann explique comme il suit la transformation de la tyrosine par la putréfaction.



En résumé, des recherches des auteurs et de nos propres expériences, il paraît bien découler que l'importance des acides aminés dans l'organisme vivant est considérable.

CHAPITRE VI

Les causes de la diazoréaction d'Ehrlich

§ 1. HISTORIQUE.

§ 2. ETUDE DE LA MATIÈRE COLORÉE.

§ 3. RECHERCHES PERSONNELLES.

§ I. Historique

D'après *Ehrlich*, les composants connus de l'urine sont sans influence sur la production de la réaction ; de là, la conclusion que la réaction ne correspond pas à la présence d'un composé défini dans l'urine, néanmoins elle n'est jamais positive avec les urines normales. Divers auteurs ont tenté d'expliquer les causes de la réaction :

Brieger et Ehrlich (1) ont essayé d'isoler la substance mystérieuse. L'urine est traitée par l'acétate neutre de plomb ; le filtrat est additionné d'acétate basique et le précipité obtenu lavé à l'eau est traité par l'acide sulfhydrique. Le liquide, séparé du sulfure de plomb, placé au bain marie et réduit, est traité ensuite par une solu-

(1) BRIEGER et EHRLICH cités par Clémens (Deutsche arch. für Klin med. Liepsig 1899 et Wiener Med. 1899.

tion d'acide oxalique dans l'alcool. Filtration pour séparer l'oxalate d'urée. La solution, replacée au bain marie et libérée des sels minéraux insolubles, est alors chauffée avec du carbonate de chaux. Nouvelle filtration ; il reste en solution un sel de chaux soluble dans l'alcool et insoluble dans l'éther, ce qui permet de le précipiter et de le transformer ensuite en sel de zinc qui donne très nettement la réaction. Cette expérience qui isolait le ou les produits actifs de la réaction n'a pas permis à ses auteurs d'en déterminer la nature chimique.

Clemens, reprenant la technique d'Ehrlich, ajoute que le corps qui donne la diazoreaction est précipitable par l'acide tannique ; mais il ne peut le régénérer en ajoutant de l'acide chlorhydrique ; il résume ainsi les différentes recherches qu'il a entreprises après Brieger et Ehrlich, Eschrich, Munson et Veitel, Luzatti et Oliva.

I. La substance qui produit la diazoreaction est soluble dans l'alcool et dans l'eau, insoluble dans les principaux dissolvants organiques, éther, chloroforme, éther acétique, xylol, benzine.

II. Le corps supporte bien le chauffage en solution acide mais se modifie facilement par la chaleur en milieu alcalin. A l'état sec, en résidu d'évaporation il se conserve très longtemps. En diluant ce résidu, Clémens a pu obtenir, après plusieurs mois, une réaction de même intensité.

III. Sous l'action du lait de chaux, de l'acétate basique de plomb et du nitrate acide de mercure, la plus grande partie du composé resté sur le filtre, le liquide filtré ne donne plus d'une façon aussi intense la diazoreaction.

Læper et Oppenheim (1) ont entrepris quelques recher-

(1) LÆPER et OPPENHEIM. Gazette des hôpitaux 1901

ches sur ce point. Ils ont traité une urine de typique, après dessiccation, par de l'éther, éther acétique, chloroforme, sulfure de carbone, xylol, benzine et ont reconnu qu'il est impossible d'obtenir de coloration avec ces différents solvants, le corps qui donne naissance à la diazoreaction, étant insoluble dans tous ces réactifs. Seul le mélange d'éther-chloroforme paraît en prendre une minime partie, il en est de même de l'alcool amylique. Le corps en question est fixé par le noir animal, d'où les solvants indiqués plus haut n'arrivent pas à l'enlever, les auteurs concluent qu'il peut être assimilé aux substances colorantes.

Ils n'ont pas ajouté que ce corps pouvait être insoluble dans ces dissolvants, ce qui résulte bien de leurs expériences. Ils pouvaient essayer d'autres solvants tels que l'alcool légèrement ammoniacal.

L'urine positive et chauffée à 115-120° donne la réaction avec la même intensité. Les produits de distillation d'une urine positive ne donnent pas la réaction.

Dolgoft (1). Nous ne citerons que pour mémoire ses recherches sur les bandes d'absorption spectrales.

Monfet (2) attribue la réaction d'Ehrlich aux dérivés sulfoconjugués de l'indol et du scatol dans l'urine normale et aux glycoconjugués dans les urines pathologiques. Il opère de la façon suivante : il précipite dans l'urine les phénols sulfoconjugués et glycoconjugués par l'acétate de plomb ammoniacal, le précipité est traité par une solution chaude d'acide tartrique pour enlever le plomb, les liquides filtrés donnent la diazo-réaction positive, que l'urine renferme ou non de l'indican. Il ajoute

(1) DOLGOFF. Med. gazette 1896.

(2) MONFET. C. R. Société biologique 7 novembre 1903.

que la réaction est plus intense dans les urines à indican. La diazo-réaction, dit-il, étant négative avec les phénols, sulfates et crésols sulfates, on est conduit à la rattacher aux composés de l'indol et du scatol. Il vérifie son hypothèse dans ce fait que l'extrait aqueux d'*indigofera officinalis* traité comme il a traité les urines donne la diazo-réaction.

Les recherches de Monfet prêtent à la critique une trop large surface pour qu'on puisse attacher à ses conclusions une grande importance. Ainsi, après avoir traité l'urine par l'extrait de saturne ammoniacal et le précipité par l'acide tartrique, il a bien enlevé le plomb mais il a régénéré l'indol, le scatol, les phénols ; de plus, parmi les corps précipitables par le sous-acétate de plomb ammoniacal se trouve le corps donnant la réaction qui est également régénéré par le traitement à l'acide tartrique, tous ces corps passent dans le filtrat et expliquent ainsi pourquoi l'auteur obtient un résultat positif, que l'urine renferme ou non de l'indican. Nous ne pouvons accepter la confirmation de l'hypothèse annoncée par Monfet dans la production de la diazoréaction avec l'extrait aqueux d'*indigofera officinalis*, cette plante et cet extrait ne contenant pas, à notre connaissance, de l'indol mais renfermant des matières organiques très complexes qui peuvent, ou ne peuvent pas donner la diazoréaction en dehors de l'indigotine. D'ailleurs quand on extrait l'indol d'une urine riche en indoxyle et qu'on soumet ce corps à la diazoréaction on n'obtient qu'une réaction négative : il se produit une coloration jaune orange de la mousse et du liquide.

Pauly (1) obtient une diazoréaction positive avec l'his-

(1) PAULY. Zeit. phys. chem. t. 42 p. 508, 1904.

tidine, mais il déclare lui-même que cette réaction s'obtient avec la tyrosine.

Hugounenq accordant à l'histidine la même propriété, nous réservons nos observations à ce sujet après la citation de son travail.

Pauly pouvait soupçonner la tyrosine comme étant la cause de la diazo-réaction car il prétend obtenir avec ce corps un azoïque rouge. Nous n'avons jamais pu l'obtenir malgré plusieurs essais méticuleux, il nous semble que cet auteur se trouvait en présence de tyrosamines. Nous doutons de la formation d'un azoïque dans cette réaction pour deux raisons.

1°. Par hypothèse chimique basée sur sa constitution, la tyrosine étant un acide aminé dont le groupement amidogène est saturé, intra-moléculairement, par le groupe acide, un diazoïque ne pourrait se former que si le groupement aminé était libre.

2°. En opérant sur des quantités appréciables de tyrosine cristallisée en solution concentrée nous n'avons jamais pu précipiter l'azoïque soit par le chlorure de sodium, le sulfate de soude ou l'acétate de soude. D'ailleurs d'après Rivier (1) la tyrosine, l'acide phénique, l'éther sulfurique, l'acide éther sulfurique de Nietzki n'ont aucune tendance à s'unir au corps diazoïque pour donner la diazoréaction d'Erlich.

Hugounenq (2) enseigne que la diazoréaction du début de la fièvre typhoïde appartient à un groupe de composés qui présentent dans leur molécule le noyau de l'imidazol. Ce groupement existe dans un acide aminé dé-

(1) RIVIER. Thèse Paris 1898.

(2) HUGOUNENQ in Presse médicale n° 83 p. 852, 1913.

couvert par Kossel et retrouvé après lui dans la plupart des matières protéiques : l'histidine ou imidazol-alanine. Or, l'histidine abonde : 11 % dans le complexe moléculaire de l'hémoglobine : et c'est d'ordinaire de ce pigment qu'on la retire quand on veut en préparer une certaine quantité. Au début de la fièvre typhoïde, vers le premier septénaire, les choses se passent comme si on assistait à une destruction intense de l'hémoglobine ; l'histidine ou des peptides riches en histidine sont libérés, au cours de cette hémoglobinurie, en proportion trop élevée pour être entièrement détruits ; le rein laisse passer l'histidine, c'est-à-dire le noyau de l'imidazol : la réaction d'Ehrlich est positive. Mais ajoute-t-il, s'il en est bien ainsi, toute destruction globulaire massive doit pouvoir, dans certaines circonstances, provoquer par un mécanisme analogue la réaction d'Ehrlich ; ce syndrome urinaire pourrait bien se retrouver dans la granulie, par exemple, c'est ce que l'expérience vérifie.

Nous nous permettrons cependant de signaler qu'ayant eu l'occasion d'examiner une urine provenant d'une malade atteinte d'infection puerpérale, urine mélangée à une notable quantité de sang d'origine indéterminée, nous avons diazoté cette urine selon la méthode d'Ehrlich et la réaction s'est montrée absolument négative. Et cependant nous obtenons fréquemment des diazoréactions positives chez des infectées de cette nature et dont les urines ne renferment pas de sang. Voilà donc un fait en faveur de nos idées et si nous appliquons à cette expérience les raisons que nous donnons pour la tyrosine (page 71) au sujet de l'expérience de Pauly, nous constatons que l'histidine comme la tyrosine est un amino acide qui n'a pas de groupe aminé libre et en conséquence ne

peut donner naissance à un azoïque. Il est donc vraisemblable que le professeur Hugounenq en parlant de l'histidine s'est trouvé en présence d'histamine. Dans notre chapitre II page 27, nous donnons le procédé pour obtenir l'azoïque de l'histamine et le caractériser.

Boudzynsky-Dombrowsky et Paneck (1) écrivent que les acides oxyprotéiques et antoxyprotéiques donnant la diazoréaction sont peut être la cause de cette réaction dans l'urine. Nous rappelons que ces acides se trouvent dans les urines normales, possèdent une molécule sulfurée et précipitent par les sels de mercure.

II. Etude de la substance colorée

Pour *Ehrlich et Clémens*, la substance colorante est précipitable par la lessive de soude, elle ne se dissout ni dans l'éther, le chloroforme, l'alcool amylique, mais seulement et légèrement dans l'huile d'aniline.

Proscher a recherché la nature de la matière colorante qui se forme dans la nouvelle réaction d'Erlich à la diméthylamidobenzaldéhyde, avec laquelle il se produit une coloration rouge ; quand l'urine est traitée par la formaldéhyde, la réaction ne se produit plus.

Avec une réaction positive, il obtient 1 gramme de produit pour 100 litres d'urine pathologique. Il opère de la façon suivante : trois litres d'urine sont additionnés de 20 à 30 centimètres cubes d'une solution chlorhydrique de réactif à 20. % et de 100 cm³ d'acide chlorhydrique concentré. Le liquide est saturé par le sulfate d'ammoniaque, on extrait la matière colorante par le chloroforme.

(1) BONDZYSKY-DOBROWSKY et PANECK (Zetl. phys. Ch. t. 46 p. 83-124 12/10)

Après évaporation, la poudre obtenue est rouge, soluble dans l'alcool, l'acide acétique, le chloroforme, les chlorhydrines, peu soluble dans l'eau ; insoluble dans la benzine, l'éther, la ligroïne. La potasse et l'ammoniaque la dissolvent avec coloration jaune, l'acide picrique en solution alcoolique précipite en brun rouge. Ce corps aurait pour formule $C^{16}H^{24}O^6Az^2$. D'après l'auteur, le radical aldéhydique serait uni au corps inconnu cherché qui serait une acétylpentosamine ou une formylglucosamine.

Nous citerons simplement *Jaffé* (1), mais en insistant sur ce point que les produits qu'il obtient dans l'urine des lapins provenaient du réactif introduit dans l'organisme. Il a ainsi obtenu des dérivés benzoyl-glycuroniques et benzoïques. *Guillemin* propose une modification dans le mode opératoire, pour obtenir le maximum de coloration, l'auteur indique de prendre 2 cm² 1/2 d'urine ajouter 2 cm³ 1/2 de réactif sulfanilique, puis 11 gouttes de solution de nitrite de soude, agiter, additionner enfin de V à VI gouttes d'ammoniaque. Agiter vigoureusement. Il est important dit-il de n'ajouter l'ammoniaque qu'en dernier lieu pour ne pas obtenir de résultat erroné.

Nous n'admettons pas cette manière d'opérer car il est de toute évidence que l'acide sulfanilique doit être diazoté avant son action sur le groupe amidogène de l'amine à caractériser. S'il a obtenu des résultats positifs, cet auteur se trouvait certainement en présence d'une grande quantité de tyrosamine et ses réactions positives auraient été beaucoup plus intenses s'il avait opéré différemment.

(1) JAFFÉ. Zeit. Phys. ch. t. 43 p. 374-396.

GUILLEMIN. Contribution à l'étude de la diazoreaction. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 40, p. 73-88 ; 1900.

L'importance qu'il attribue à l'action de l'ammoniaque après la diazotation est de toute nécessité, les azoïques ne se formant qu'en milieu franchement acide et la coloration n'apparaît qu'en milieu alcalin.

§ III Recherches personnelles

La propriété des substances diazoïques de s'unir aux corps de la série aromatique pour former des azoïques colorés est un fait bien acquis.

Nous savons que la diazo-réaction d'Ehrlich résulte de la transformation d'un corps amido-benzénique, l'acide sulfanilique, en une substance diazoïque, le sulfodiazobenzol, au contact de l'acide nitreux naissant.

Mis en présence d'un corps de la série aromatique ayant une fonction amine le sulfodiazobenzol donnera naissance à un chromogène, qui vire sous l'influence d'un alcali.

Selon Ehrlich et de nombreux auteurs, la composition de l'urine serait sans influence sur cette réaction, de même les substances connues ou habituelles de l'urine : urée, créatinine, acide urique, acide oxalique, taurine, acide glycollique, acides gras liquides et leurs sels, sucre et albumine.

Les pigments biliaires, l'urobiline ne donnent que des réactions très faciles à différencier.

D'après Rivier l'acide indoxylsulfurique, la bilirubine seraient également sans action. Bien que cet auteur ait émis l'opinion que la tyrosine n'avait aucune tendance à s'unir aux diazoïques pour donner la diazoréaction, nous nous sommes appliqués à obtenir, avec de la tyrosine, extraite de la soie selon Abderhalden, un azoïque.

En opérant suivant Ehrlich, nous avons obtenu, une belle coloration jaune orange avec l'acide sulfanilique diazoté. Dans cette réaction nous nous sommes assurés que cette coloration était bien le fait de la fonction phénolique de la tyrosine (voir page 21), d'ailleurs les colorations obtenues avec des phénols dans les mêmes conditions sont jaune franc. Nous avons ainsi la preuve que la tyrosine pouvait être influencé par le sulfodiazobenzol.

Nous allons expliquer brièvement les raisons qui nous ont fait admettre la possibilité de l'action des tyrosamines : L'influence des acides protéiques et de leurs dérivés étaient à éliminer facilement ; tous ces corps représentent une molécule protéique assez grosse, polypeptides vraisemblablement, quelques-uns sont même sulfurés. Ils précipitent tous par les sels de plomb et de mercure alors que le corps en cause dans la diazoréaction n'est pas précipité par ces réactifs.

L'histidine, acide-aminé du groupe des bases hexoniques, est précipité par l'acide phosphotungstique ou phosphomolybdique et notre corps chromogène n'est pas précipité dans ces conditions ; l'amine correspondante à l'histidine (B-imidazoléthylamine) nous donnait des azoïques fragiles, fugaces et se détruisant par une très légère élévation de température. C'est alors que nous avons été amenés à envisager la présence d'un corps différent de l'histidine, comme seule cause de la diazoréaction d'Ehrlich ; mais sans oublier l'action du sulfodiazobenzol sur la tyrosine. Croyant obtenir dans cette réaction, un azoïque nous avons essayé de le précipiter à l'état cristallisé. Nos expériences furent longues, répétées et oné-

reuses, nous nous adressions à de la tyrosine pure, elle n'en fut pas moins rebelle à tous nos précipitants.

C'est alors qu'il nous vint à l'idée de rechercher ce corps dans les urines ; convaincu de son importance, puisque nous le trouvions même dans les urines normales et étudiant sa formation dans les processus biologiques, nous avons été naturellement conduit à vouloir connaître l'amine correspondante à la tyrosine. Après avoir institué notre procédé d'extraction des tyrosamines (page 20), nous l'avons appliqué avec succès à l'ergot de seigle, à de la caséine putréfiée et avons identifié les azoïques obtenus avec ceux de la paraoxyphényléthylamine synthétique et de l'hordénine. Il nous est apparu que nous avions en main un procédé précis susceptible de nous donner quelques succès en l'appliquant à l'urine. Nos recherches portèrent sur des urines de typhiques, d'érysipélateux et d'infectées puerpérales et nos espérances furent bientôt réalisées.

Nous obtenions avec ces tyrosamines extraites de l'urine, de l'ergot de seigle, de la caséine, avec de l'hordénine et de la paraoxyphényléthylamine, des diazoréactions très fortement positives et des azoïques caractéristiques. Nos expériences étaient concluantes : *la diazoréaction d'Ehrlich était bien produite par des tyrosamines.*

Nous ne saurions trop insister sur ce point que pour obtenir des azoïques cristallisés avec des urines, il faut opérer sur des urines à diazoréaction franchement positives ; dans le cas contraire, il est nécessaire de procéder à une extraction portant sur 400 ou 500 grammes d'urine faiblement positive. Nous avons observé que la coloration rose ou rouge de la mousse surnageant la réaction était fonction de la quantité de tyrosamines. Ainsi en

opérant sur 10 cm³ d'une urine qui ne présenterait qu'une diazo-réaction dont la couleur orangé rouge n'intéresserait que le liquide sans influencer la mousse, on obtiendrait avec la même urine une diazo-réaction positive intense de la mousse et du liquide si on opérait avec le résidu d'extraction des tyrosamines ayant porté sur 300 ou 400 cm³ de l'urine.

En conséquence, nous estimons qu'une diazo-réaction doit être considérée comme positive lorsque le liquide seul est coloré en orange rouge c'est-à-dire vermillon.

Par ces expériences nous pensons avoir démontré que la diazo-réaction d'Erlich trouve son explication dans la présence des tyrosamines dans l'urine pathologique.

CONCLUSIONS

I. — Nous apportons à la chimie biologique :

a) un procédé de recherche et de dosage de la tyrosine pouvant s'appliquer à des quantités extrêmement faibles de produit ;

b) une méthode de recherche des tyrosamines par formation d'un diazoïque rouge avec le sulfodiazobenzol ;

c) un moyen de caractériser les azoïques formés dans la réaction précédente.

II. Nous donnons des réactions très sensibles de l'adrénaline, de l'hordénine, de l'histamine.

III. — Nous permettons de différencier nettement les tyrosamines de l'histamine.

IV. — Nous démontrons que la tyrosine existe normalement dans l'urine et, en ce faisant, nous contribuons, dans une petite mesure, à restreindre le champ de l'indosé urinaire.

V. — Grâce à nos procédés, nous avons décelé la présence des tyrosamines dans :

1° le lait ;

2° les produits opothérapiques (ovaires, glandes mammaires etc...) ;

3° les diastases digestives, pepsine, pancréatine et leurs produits de digestion : peptones ;

4° les urines pathologiques ;

5° le sperme ;

6° les crachats.

Nous n'avons pu les trouver dans le sang.

VI. — Nous déterminons la cause de la diazo-réaction d'Ehrlich.

A côté de ces faits acquis, nous entrevoyons la possibilité, par le dosage de ces amines, de mesurer l'activité thérapeutique des produits opothérapiques et des diastases, de déterminer l'intensité d'un processus microbien et de mesurer la toxicité des urines d'après leur teneur en tyrosine et en tyrosamines. Ce sont là, certes, des hypothèses ; nous comptons poursuivre leur vérification.

Vu et approuvé :

Nancy, le 18 juin 1914,

Le Directeur de l'Ecole Supérieure de Pharmacie,
D^r C. BRUNTZ

Vu et permis d'imprimer :

Nancy, le 19 juin 1914,

Le Recteur de l'Académie,
Ch. ADAM
Membre de l'Institut.

Table des Matières

INTRODUCTION.	7
CHAPITRE I. — Réactions de la Tyrosine et des Tyrosamines	13
§ I. — Réactions de la tyrosine.	13
§ II. — Réactions des tyrosamines.	13
CHAPITRE II. — Recherche et dosage de la tyrosine et des tyrosamines.	17
§ I. — Recherche et dosage de la tyrosine.	17
§ II. — Recherche des tyrosamines.	23
§ III. — Caractérisation des diazoïques.	25
ANNEXE. — Procédés de recherches des acides aminés en général.	30
CHAPITRE III. — La tyrosine et les tyrosamines chez les êtres vivants.	41
§ I. — Considérations générales.	41
§ II. — La tyrosine dans les urines.	43
§ III. — Les tyrosamines dans les produits opothérapiques, le lait, etc.	47
CHAPITRE IV. — Formation des amines cycliques.	51
CHAPITRE V. — Régression des acides aminés dans l'organisme.	59
CHAPITRE VI. — Les causes de la diazoréaction d'Ehrlich.	67
§ I. — Historique.	67
§ II. — Etude de la matière colorée.	73
§ III. — Recherches personnelles.	73
CONCLUSIONS.	79

OLLIER-HENRY, EDITEUR
26, Rue Monsieur-le-Prince, V^{le}
PARIS
